

**Eine experimentelle Pilotstudie an Ratten zur Eignung der  
systemischen intravenösen Injektion von Adeno-assoziierten  
Viren (AAVs) als neue Applikationsmöglichkeit  
in der kardialen Gentherapie**

von Jasmin Köhler geb. Biehle

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Eine experimentelle Pilotstudie an Ratten zur Eignung der  
systemischen intravenösen Injektion von Adeno-assoziierten  
Viren (AAVs) als neue Applikationsmöglichkeit  
in der kardialen Gentherapie**

von Jasmin Köhler geb. Biehle

aus Bad Säckingen

München 2017

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Lehrstuhl für Tierphysiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Univ.-Prof. Dr. med. vet. Manfred Stangassinger

Angefertigt in der Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Heidelberg  
Innere Medizin III: Kardiologie, Angiologie und Pneumologie  
Univ.-Prof. Dr. med. Patrick Most

**Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Manfred Stangassinger

**Korreferent:** Univ.-Prof. Dr. Dr. Michael H. Erhard

**Tag der Promotion:** 11. Februar 2017

Für meine Familie,  
insbesondere meinen Großeltern  
und meinem Mann Daniel!

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Gentherapie.....</b>	<b>3</b>
1.1	Grundprinzip .....	3
1.2	Kardiale Gentherapie.....	5
1.3	Gentherapie in der Tiermedizin.....	7
<b>2.</b>	<b>Adeno-assoziierte-Viren (AAV) .....</b>	<b>8</b>
<b>3.</b>	<b>Das calciumbindende Protein S100A1.....</b>	<b>10</b>
<b>4.</b>	<b>Die Ratte als kardiovaskuläres Versuchsmodell .....</b>	<b>12</b>
<b>5.</b>	<b>Fragestellung und Ziel der Arbeit .....</b>	<b>14</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>15</b>
<b>1.</b>	<b>Versuchstiere und Haltungsbedingungen .....</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung.....</b>	<b>16</b>
<b>3.</b>	<b>Versuchsdurchführung.....</b>	<b>18</b>
3.1	Virusinjektion/Gentransfer.....	18
3.2	Linksventrikulärer Druck-Volumen-Katheter.....	20
3.3	Western Blot.....	24
3.3.1	Gewebeaufreinigung .....	24
3.3.2	Proteinbestimmung.....	26
3.3.3	Western Blot.....	26
3.4	Immunhistochemie .....	28
3.4.1	Organeinbettung in Paraffin .....	28
3.4.2	Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten .....	29
3.4.3	Entparaffinierung und Rehydratation.....	30
3.4.4	Färbung.....	30
3.5	Reverse Transkriptase – Polymerase – Kettenreaktion (RT-PCR) .....	32
3.5.1	Gewebeaufreinigung und RNA Isolation .....	33
3.5.2	RNA Quantifizierung .....	33
3.5.3	Reverse Transkription .....	33

3.5.4	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) .....	34
3.6	Bestimmung der viralen Genkopien im Gewebe .....	37
3.6.1	Gewebeaufreinigung und DNA-Isolation .....	37
3.6.2	Vorbereitung des Plasmidstandards .....	39
3.6.3	Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) .....	39
3.7	Statistische Auswertung .....	41
3.8	Eingesetztes Material .....	42
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>47</b>
<b>1.</b>	<b>Ergebnisse zum Erfolg des Gentransfers .....</b>	<b>47</b>
1.1	Transduktion.....	48
1.2	Transkription .....	50
1.3	Translation.....	61
1.4	Ergebnisse von Korrelationsanalysen .....	64
1.5	Ergebnisse von immunhistologischen Färbungen an Gewebeschnitten des Herzens.....	72
<b>2.</b>	<b>Ergebnisse zu den Nebenwirkungen des intravenösen Gentransfers..</b>	<b>81</b>
2.1	Laboranalytisch erfasste Blutparameter .....	81
2.1.1	Elektrolyte .....	81
2.1.2	Leberfunktionsparameter .....	83
2.1.3	Blutgerinnungsparameter .....	84
2.1.4	Nierenfunktionsparameter .....	86
2.2	Parameter der Herzfunktion .....	87
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>89</b>
<b>1.</b>	<b>Versuchsmodell.....</b>	<b>90</b>
<b>2.</b>	<b>Kardialer Gentransfers nach intravenöser Getherapie .....</b>	<b>91</b>
<b>3.</b>	<b>Einfluss der intravenösen Applikation auf die Verteilung der S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten im Myokard.....</b>	<b>96</b>
<b>4.</b>	<b>Biodistribution des AAV9-Vektors nach systemischer intravenöser Applikation .....</b>	<b>97</b>
<b>5.</b>	<b>Gesundheitliche Auswirkungen der systemischen intravenösen Virus-Applikation .....</b>	<b>100</b>
<b>6.</b>	<b>Herzfunktionsbeeinflussung durch den S100A1 Gentransfer .....</b>	<b>103</b>

---

<b>7.</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>104</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>106</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY.....</b>	<b>109</b>
<b>VIII.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>111</b>
<b>IX.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>124</b>



**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung II.1	Dreidimensionale Struktur eines calciumbindenden S100A1 Dimers
Abbildung II.2	Der Gefäßbaum dorsal des Rattenherzens
Abbildung III.1	Zeitlicher Ablauf der Studie
Abbildung III.2	Schema der AAV9 – CMV/MLC260-S100A1 Virusinjektion
Abbildung III.3	Linksventrikuläre Druck – Volumenmessung
Abbildung III.4	Schemazeichnung der idealen Position des Druck-Volumen Katheters im linken Ventrikel und ein Beispiel für die dazugehörige Druck–Volumen-Kurve
Abbildung III.5	Schema zum Ablauf eines Western Blots
Abbildung III.6	Schema zum Ablauf der immunhistochemischen Detektion des S100A1-Proteins in Gewebeschnitten
Abbildung III.7	Mikrotom mit eingespanntem Paraffinblock
Abbildung III.8	Schema zum Ablauf der RT-PCR
Abbildung III.9	Schema zum Ablauf der qPCR
Abbildung IV.1	Organspezifische Ergebnisse der Transduktion nach intravenöser Virus-Applikation bei Ratten
Abbildung IV.2	Organspezifische mRNA Expressionslevel des endogenen rS100A1 nach intravenöser Virusapplikation bei Ratten
Abbildung IV.3	Vergleich der mRNA Expressionslevel für rS100A1 im linken und rechten Ventrikel des Herzens der Ratte nach intravenöser Virusapplikation

Abbildung IV.4	Organspezifische mRNA-Expressionslevel des endogenen rS100A1 nach intravenöser Virus-Applikation bei der Ratte
Abbildung IV.5	Organspezifische mRNA Expressionslevel des humanen hS100A1 nach intravenöser Virus-Applikation bei Ratten
Abbildung IV.6	Organspezifische mRNA-Expressionslevel des humane hS100A1 nach intravenöser Virus-Applikation bei der Ratte
Abbildung IV.7	Organspezifische mRNA Expressionslevel des Gesamt- S100A1 nach intravenöser Virus-Applikation bei Ratten
Abbildung IV.8	Organspezifische mRNA-Expressionslevel der Gesamt-S100A1 nach intravenöser Virus-Applikation bei der Ratte
Abbildung IV.9	Vergleich der mRNA Expressionslevel für die Gesamt-mRNA im linken und rechten Ventrikel des Herzens der Ratte nach intravenöser Virus-Applikation
Abbildung IV.10A	Dosisabhängige S100A1 Proteinexpression im LV der Rattenherzen nach intravenöser Virus-Applikation
Abbildung IV.10B - D	Dosisabhängige S100A1 Proteinexpression im RV des Rattenherzens, in der Leber und der Niere nach intravenöser Virus-Applikation
Abbildung IV.10E – F	Dosisabhängige S100A1 Proteinexpression in der Milz und im Gehirn nach intravenöser Virus-Applikation bei Ratten
Abbildung IV.11	Graphische Darstellung des Zusammenhangs der intravenös applizierten Virus-Dosis mit der gemessenen Zahl an viralen Genomkopien in Gewebeproben der untersuchten Organe von Ratten

Abbildung IV.12	Graphische Darstellung des Zusammenhangs der intravenös applizierten Virus-Dosis mit der S100A1 Proteinexpression in den Organen LV und RV des Herzens und der Leber von Ratten
Abbildung IV.13	Graphische Darstellung des Zusammenhangs der intravenös applizierten Virus-Dosis und der S100A1 Proteinexpression in der Niere und der Milz von Ratten
Abbildung IV.14	Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Organdurchblutung mit der Zahl an gemessenen viralen Genomkopien in den untersuchten Geweben bei den drei applizierten Virus-Dosierungen bei Ratten
Abbildung IV.15	Graphische Darstellung des S100A1 exprimierenden Areals in Gewebeschnitten vom LV und RV des Rattenherzens
Abbildung IV.16	Immunhistologisch gefärbte Gewebeschnitte des LV des Rattenherzens bei 4-facher Vergrößerung
Abbildung IV.17	Immunhistologisch gefärbte Gewebeschnitte des RV des Rattenherzens bei 4-facher Vergrößerung
Abbildung IV.18	Einzelwerte des S100A1 exprimierenden Areals im LV des Rattenherzens
Abbildung IV.19	Einzelwerte des S100A1 exprimierenden Areals im RV des Rattenherzens
Abbildung IV.20	Mittlere Standardabweichung aller mittels Gesamtmittelwerte relativierten S100A1 exprimierenden Zellen zur Darstellung deren Homogenität in Gewebeschnitten vom LV und RV des Rattenherzens
Abbildung IV.21A	Gefäßdarstellung in immunhistologisch gefärbten LV-Gewebeschnitten des Rattenherzens bei 10-facher Vergrößerung

Abbildung IV.21B	Gefäßdarstellung im immunhistologisch gefärbten LV-Gewebeschnitt des Rattenherzens LV bei 40-facher Vergrößerung
Abbildung IV.22	Gefäßdarstellung in immunhistologisch gefärbten RV-Gewebeschnitten des Rattenherzens bei 10-facher Vergrößerung
Abbildung IV.23	Gehalte der Blutplasmaelektrolyte bei Ratten an Tag 42 nach intravenöser NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation
Abbildung IV.24	Leberfunktionswerte bei Ratten am Tag 42 nach intravenöser NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation
Abbildung IV.25	Blutgerinnungsparameter bei Ratten am Tag 42 nach intravenöser NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation
Abbildung IV.26	Nierenfunktionswerte bei Ratten am Tag 42 nach intravenöser NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation
Abbildung IV.27	Parameter der systolischen Herzfunktion bei Ratten am Tag 42 nach intravenöser NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation
Abbildung IV.28	Parameter der diastolischen Herzfunktion bei Ratten am Tag 42 nach intravenöser NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation

## **TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle III.1	Gruppeneinteilung
Tabelle III.2	Organgewicht und Volumen des Extraktionspuffers
Tabelle III.3	Einstellungen für die Peqlab Kugelmühle zur Homogenisierung unterschiedlicher Organgewebe-Proben
Tabelle III.4	Reaktionsprotokoll mit der Reversen Transkriptase
Tabelle III.5	PCR Reaktionsansatz (Master Mix)
Tabelle III.6	Verwendete Primer (alle von der Firma MWG)
Tabelle III.7	Gewichtsangaben für Gewebeaufreinigung
Tabelle III.8	PCR Reaktionsansatz (Master Mix)
Tabelle III.9	Verwendete Primer und Sonde
Tabelle IV.1	Korrelationskoeffizient nach Pearson für die intravenös applizierten Virus-Dosierungen vs. die in den Organen gemessenen Zahl an VGCs und das Ergebnis des zugehörigen T-Tests
Tabelle IV.2	Korrelationskoeffizient nach Pearson für die intravenös applizierten Virus-Dosierungen vs. S100A1 Proteinexpression und das Ergebnis des zugehörigen T-Tests
Tabelle IV.3	Korrelationskoeffizient nach Pearson für die intravenös applizierten Virus-Dosierungen vs. S100A1 Proteinexpression und das Ergebnis des zugehörigen T-Tests
Tabelle IV.4	Blutflussraten der einzelnen Organe der Sprague-Dawley Ratte (modifiziert nach (PETERS, 2012))

Tabelle IV.5	Korrelationskoeffizient nach Pearson für die organspezifische Durchblutung vs. der in den Organen gemessenen Zahl an VGCs und das Ergebnis des zugehörigen T-Tests
Tabelle IV.6	Parameter der systolischen und diastolischen Herzfunktion bei Ratten an Tag 42 nach der intravenösen NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation
Tabelle V.1	Werte der humanen S100A1 Expression im linken und rechten Ventrikel des Rattenmykards nach i.v. Applikation in drei Dosierungen

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AAV	Adeno-assoziierte Viren
ALT	Alanin-Aminotransferase
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AST	Aspartat-Aminotransferase
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DEPC	Diethyldicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRK2	G-gekoppelte Rezeptorkinase 2
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IHC	Immunohistochemie
kb	Kilobyte
kDa	Kilo Dalton
LV	Linker Ventrikel
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
PVDF	Polyvinylidenfluorid
rpm	revolutions per minute = Umdrehungen pro Minute
RV	Rechter Ventrikel
SDS- PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis = Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Serca2a	Sarkoplasmatische Retikulum Ca <sup>2+</sup> ATPase
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
VGC	virale Genomkopien
WB	Western Blot

## I. EINLEITUNG

Das bessere Verständnis vieler pathologischer Vorgänge bei kardiovaskulären, infektiösen, vererbbaaren oder tumorösen Erkrankungen ist auf bedeutende wissenschaftliche Fortschritte in den Gebieten der Genetik und der Molekularbiologie zurückzuführen (RINCON et al., 2015). Dadurch wurde auch der Grundstein für eine neue Therapiemöglichkeit gelegt, die Behandlung von Krankheiten auf molekularer Ebene. So können präzisere und dadurch auch wirksamere Therapieansätze entwickelt werden (MULLIGAN, 1993; VINGE et al., 2008).

In der Veterinärmedizin stellt die Herzinsuffizienz, ebenso wie in der Humanmedizin, eine der häufigsten Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems dar. Charakteristisch ist der Verlust der Pumpkraft des Herzmuskels. Das dadurch verminderte Schlagvolumen reicht nicht aus, um die stoffwechselbedingten Anforderungen des Körpers über das Blut zu erfüllen (KATZ et al., 2011). Es gibt zudem auch viele Veränderungen auf molekularer Ebene wie z.B. einen veränderten Calciumstoffwechsel (BRAUNWALD, 1981; HOUSER et al., 2000; JASKI et al., 2009).

Die derzeitige Standardtherapie der Herzinsuffizienz basiert noch immer auf der symptomatischen, medikamentösen Therapie durch ACE-Hemmer,  $\beta$ -Blocker und Aldosteron-Rezeptor-Antagonisten (VINGE et al., 2008; ATKINS et al., 2009). Dadurch kann die Erhaltung der linksventrikulären Pumpfunktion, aber keine Verbesserung oder Heilung erreicht werden. In der Humanmedizin gibt es zudem die Möglichkeit der elektrophysiologischen oder herzchirurgischen Therapie (RAAKE & PLEGER, 2010; RAAKE et al., 2011), die jedoch nur für einen geringen Prozentsatz der Patienten in Frage kommt.

Vor diesem Hintergrund stellt die Möglichkeit einer kausalen Therapie auf molekularer Ebene einen interessanten neuen Therapieansatz dar (TILEMANN et al., 2012). Dabei wird genetisches Material über eine Genfähre, einen sogenannten Vektor, in Körperzellen gebracht, um dort einen therapeutischen Nutzen durch die Funktion oder Expression des zugefügten Gens zu erhalten (HALLEK et al., 2001).

Die bisherigen Applikationsverfahren in der kardialen Gentherapie sind hauptsächlich Katheter gestützt, z.B. über eine antegrade Infusion der



Koronararterie, die mit einem chirurgischen Eingriff verbunden ist (SLEEPER et al., 2011; GREENBERG et al., 2014). Diese Applikationsart ist methodisch aufwendig und mit Risiken verbunden.

Die systemische, intravenöse Injektion könnte hierbei eine einfachere Applikationsart zur schonenderen kardialen Therapie ohne einen operativen Eingriff darstellen. In der vorliegenden Pilotstudie sollte deshalb die Durchführbarkeit dieses Applikationsansatzes im Rahmen eines experimentellen Gentransfers untersucht werden. Dabei sollte besonderer Wert auf die Darstellung der Organ-Verteilung der Adeno-assoziierten Viren (hier: AAV9) und des zugefügten Gens (hier: S100A1) im Körper nach intravenöser Injektion, insbesondere zur Abschätzung der daraus resultierenden Risiken, gelegt werden. Zusätzlich sollte dabei auch ein erster orientierender Einblick in die Praxistauglichkeit und die therapeutische Funktionsfähigkeit dieser Therapie einschließlich ihrer Nebenwirkungen gegeben werden.

## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Gentherapie**

#### **1.1 Grundprinzip**

Die Gentherapie basiert im Wesentlichen auf dem Einbringen von genetischem Material in gewünschte Körperzellen, um nach dessen Expression Krankheiten zu behandeln (MULLIGAN, 1993; SLEEPER et al., 2011). Durch die Expression eines fehlenden oder eines zusätzlichen therapeutischen Proteins kann es zur Korrektur eines erblichen oder erworbenen Defekts (RAPACCIUOLO et al., 1994) und damit zu Behebung der Krankheitsursache kommen.

Um diesen therapeutischen Effekt zu erzielen, muss das genetische Material über einen Vektor in den Körper des Patienten gebracht, von den zu therapierenden Zielzellen aufgenommen und in den Zellkern eingebracht werden. Mit Hilfe der zelleigenen Proteinbiosynthese wird das eingebrachte genetische Material in den eigentlichen therapeutischen Wirkstoff, die Proteine, übersetzt (HALLEK et al., 2001).

Entsprechend der Vorgehensweise bei der Gentherapie kann diese in zwei Kategorien unterteilt werden (WILLIAMS & ORKIN, 1986; DZAU et al., 1998):

1. Bei der Keimbahn-Gentherapie wird der DNA - Gehalt einer Keimzelle oder von Zellen im frühembryonalen Stadium gentechnisch beeinflusst. Die Auswirkungen dieser Therapie betreffen nicht nur die behandelte Person, sondern auch deren Nachkommen (SADE & KHUSHF, 1998). In Deutschland ist sie aus wissenschaftlichen, medizinischen und ethischen Gründen entsprechend den Richtlinien der Ärztekammer von 1995 unzulässig und nach § 5 des Embryonenschutzgesetzes von 1990 verboten (BUNDESGESETZ, 1990; BUNDESÄRZTEKAMMER, 1995). Der Fortschritt durch neue molekulare Techniken gibt allerdings wieder Anlass zur Diskussion deren therapeutischer Anwendung, denn die Möglichkeiten der Keimbahn - Gentherapie sind nicht mehr nur theoretisch wie noch im Jahr 1990 (JORDAN, 2015).

2. Bei der somatischen Gentherapie werden genetische Informationen in Körperzellen eingeschleust, die nicht an der Fortpflanzung beteiligt sind. Die Auswirkungen beschränken sich auf den behandelten Patienten (WILLIAMS & ORKIN, 1986; KINNON & LEVINSKY, 1990). Die somatische Gentherapie kann mittels zweier Techniken durchgeführt werden (SADE & KHUSHF, 1998).

Bei der *in vivo* - Technik erfolgt die lokale oder die systemische Applikation der genetischen Information direkt in den Körper des Patienten, entweder über das Blut oder durch eine Injektion direkt in das Zielgewebe. Die Selektion des Zielgewebes kann mit Hilfe eines eingefügten Promotors erreicht werden, der nur im Zielgewebe aktiv ist.

Bei der *in vitro* - Technik werden dem Patienten aus dem Zielgewebe zuerst Zellen entnommen, die dann außerhalb des Körpers gentechnisch verändert werden. Anschließend werden diese Zellen wieder reinfundiert (COLLINS & THRASHER, 2015).

Zur intrazellulären Applikation der zusätzlichen genetischen Information gibt es unterschiedliche Vektorarten: Die nicht viralen Vektoren, wie z.B. ein Plasmid und die viralen (adenovirale, retrovirale oder Adeno – assoziierte) Vektoren. Virale Vektoren sind in der Regel effizienter und führen zu einer länger andauernden Expression (RINCON et al., 2015).

Die ursprünglichen Ziele der Gentherapie waren monogenetische Erkrankungen (HAMMOUDI et al., 2015), bei denen ein einziges Gen ursächlich für die Erkrankung ist, z.B. bei Hämophilie A und B, Mukoviszidose, Mukopolysaccharidose oder bei der Lipoproteinlipase-Defizienz. Derzeit gibt es nur eine für den Menschen zugelassene Gentherapie, und zwar für die Lipoproteinlipase-Defizienz (YLA-HERTTUALA, 2012; BUNING, 2013). Die Gentherapie wird in experimentellen Studien auch bei Infektionskrankheiten, Krebserkrankungen und kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt (COLLINS & THRASHER, 2015). Durch das dabei erzielte bessere Verständnis pathologischer Vorgänge in diesen Bereichen können Schlüsselemente, wie z. B. das Expressionsdefizit eines Proteins identifiziert und für die Gentherapie genutzt werden. Entsprechend dieser Vorgehensweise werden auch polygenetische Erkrankungen, wie z.B. die Herzinsuffizienz, für eine monogenetische therapeutische Vorgehensweise interessant.

## 1.2 Kardiale Gentherapie

Die Herzinsuffizienz ist auf molekularer Ebene durch diverse Veränderungen, wie z.B. einen gestörten Calciumstoffwechsel und eine Dysregulation des  $\beta$ -adrenergen Signalweges, gekennzeichnet (MOST et al., 2004; PLEGER et al., 2007; KATZ et al., 2011; RAAKE et al., 2011; ROHDE et al., 2011; PLEGER et al., 2013). Wichtige molekulare Zielstrukturen sind z.B. die Sarkoplasmatische Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (Serca2a), die Proteine Phospholamban und S100A1 (SLEEPER et al., 2011) oder die G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2) (RAAKE & PLEGER, 2010). Ausgerichtet auf diese potentiellen Zielstrukturen wurden bereits zahlreiche vielversprechende Gentherapie-Studien an Mäusen, Ratten und sogar an Schweinen durchgeführt (MULLER et al., 2003; PLEGER et al., 2007; PLEGER et al., 2011; RAAKE et al., 2013; RINCON et al., 2015).

In unserer Arbeitsgruppe wurden bisher Gefäßkatheter-gestützte Verfahren zur Applikation von Adenoviren und AAVs in Kombination mit S100A1 erfolgreich in Herzinsuffizienzmodellen von Ratte und Schwein eingesetzt (PLEGER et al., 2005; PLEGER et al., 2007; PLEGER et al., 2011; WEBER et al., 2014). Unter anderem wurde hierbei die retrograde Applikation der Vektoren über die Koronarvenen angewendet. Über den Koronarsinus wird ein Katheter in das koronarvenöse System eingebracht. Durch einen Ballon an der Katheterspitze kann das Gefäß blockiert werden und die Vektorlösung gelangt retrograd über die Venen in das Herz (MOST et al., 2004; PLEGER et al., 2005; PLEGER et al., 2007; PLEGER et al., 2011).

Eine Gentherapie mit AAV1/Serca2a konnte in einer ersten klinischen Studie an Menschen (CUPID IIa) erfolgreich therapeutisch eingesetzt, sowie Effektivität und Sicherheit bestätigt werden (JASKI et al., 2009; JESSUP et al., 2011; GREENBERG et al., 2014; HAMMOUDI et al., 2015). Nach aktuellsten Erkenntnissen konnte dieses Ergebnis in der Folge - Studie (CUPID IIb) jedoch nicht bestätigt werden. Die erwarteten signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Placebo-Gruppe konnten nicht aufgezeigt werden (GREENBERG et al., 2016). Dieses Ergebnis stellt zwar Serca2a als therapeutische Zielstruktur, nicht aber die gentherapeutische Vorgehensweise an sich in Frage.

Gentherapeutische Ansätze mit S100A1 werden für die klinische Verwendung in Zell (Kardiomyozyten) - und Tierversuchen geprüft (RINCON et al., 2015). Durch diese Ansätze könnte der Calciumstoffwechsel in den Kardiomyozyten normalisiert und dadurch die Herzfunktion verbessert werden, und zwar unabhängig davon, ob das ursächliche Gen bekannt ist oder nicht. Für viele Herzerkrankungen könnte sich dieser Ansatz als vorteilhaft erweisen (SLEEPER et al., 2009).

Die positiven Effekte einer S100A1 Gentherapie konnten in Tiermodellen zur Herzinsuffizienz bereits mehrfach gezeigt werden (MOST et al., 2004; PLEGER et al., 2005; PLEGER et al., 2007; PLEGER et al., 2011; MOST et al., 2013; WEBER et al., 2014).

Wichtig für den Erfolg der kardialen Gentherapie sind insbesondere die Effizienz der Gen - Transduktion in den Kardiomyozyten, sowie die Expressionsdauer und eine möglichst einfache und trotzdem sichere Vektor - Applikation.

Für die Vektorapplikation gibt es mehrere Verfahren:

Die antegrade arterielle Infusion, die retrograde venöse Infusion, die direkte intramyokardiale Injektion, die perikardiale Injektion, die epikardiale Flüssigkeitsstrahl-Injektion (liquid jet injection) und die intravenöse Injektion (TILEMANN et al., 2012; RINCON et al., 2015; FARGNOLI et al., 2016).

Bis auf die intravenöse Injektion sind alle diese Applikationsarten mit einem operativen Eingriff verbunden. Dabei variieren dessen Schweregrad und die daraus resultierenden möglichen Risiken erheblich. Die intravenöse Injektion wäre aufgrund ihrer geringen Invasivität als Applikationsart für die kardiale Gentherapie besonders geeignet. Die dadurch zu erreichende effektive Transduktion der Kardiomyozyten stellt jedoch aufgrund der im Blutkreislauf zurückzulegenden Wegstrecke eine echte Herausforderung dar. Eine deutliche Verbesserung für diese Vorgehensweise könnte der kardiale Tropismus des Vektors und dessen Verstärkung durch einen geeigneten Promotor bieten.

### 1.3 Genterapie in der Tiermedizin

Die Genterapie gewinnt in der experimentellen und therapeutischen tiermedizinischen Forschung immer mehr an Bedeutung. Sie wurde bereits in einigen Therapie - Studien zu verschiedenen Krankheitsbildern erfolgreich eingesetzt (QUINTIN-COLONNA et al., 1996; ELMSLIE & DOW, 1997; LECOUTEUR, 1999; AYUSO et al., 2006; SLEEPER et al., 2011; PAVLIN et al., 2012). Spezielle Haustier - Erkrankungen werden oft auch als Modelle für die Situation beim Menschen genutzt (CASAL & HASKINS, 2006; CALLEJAS et al., 2013), so z.B. die canine Hämophilie (WANG et al., 2000) oder die Mukopolysaccharidose (SLEEPER et al., 2004; COTUGNO et al., 2011).

Herzerkrankungen sind in der Kleintiermedizin ebenso wie in der Humanmedizin sehr relevant. Ca. 10 % aller Hunde haben ein Herzproblem. Die chronische valvuläre Herzerkrankung tritt dabei am häufigsten auf (ATKINS et al., 2009), als zweithäufigste ist die dilatative Kardiomyopathie (DCM) zu nennen (TIDHOLM et al., 2001; O'GRADY & O'SULLIVAN, 2004). Bei der Katze ist die häufigste Herzerkrankung die hypertrophe Kardiomyopathie (HCM) (FERASIN et al., 2003; RIESEN et al., 2007). Zur Erforschung humaner Kardiomyopathien werden häufig humanrelevante Tiermodelle herangezogen. Gründe dafür sind das natürliche Vorkommen der Erkrankung, die Ähnlichkeit der Krankheitsbilder (TILLEY et al., 1977; LIU & TILLEY, 1980) und teilweise auch die dafür ursächlichen Genmutationen, wie z.B. bei der familiären hypertrophen Kardiomyopathie der Main Coon Katzen (KITTLESON et al., 1999) oder der juvenilen dilatativen Kardiomyopathie der Portugiesischen Wasserhunde (WERNER et al., 2008).

## **2. Adeno-assoziierte-Viren (AAV)**

Adeno-assoziierte Viren (AAV) sind kleine Viren mit einer linearen Einzelstrang-DNA, die zur Gattung der Dependoviren und zur Familie der Parvoviren gehören (SIEGL et al., 1985; ANNE & DANIEL, 2005; ZINCARELLI et al., 2008). Sie können sich nicht selbstständig replizieren und sind deshalb auf einen Helfervirus z.B. das Adenovirus, das humane Zytomegalievirus oder das Herpesvirus angewiesen (BERNS et al., 1988; MUZYCZKA, 1992; ALAZARD-DANY et al., 2009). Bisher konnte keine humanpathogene Wirkung von AAVs nachgewiesen werden (VINGE et al., 2008; ZINCARELLI et al., 2008; TILEMANN et al., 2012; HAMMOUDI et al., 2015). Durch ihre geringe Immunogenität (ANNE & DANIEL, 2005; VINGE et al., 2008; TILEMANN et al., 2012) und aufgrund fehlender chromosomaler Integration (SLEEPER et al., 2011; HAMMOUDI et al., 2015), wie z.B. bei Lentiviren, ermöglichen AAVs einen langandauernden Gentransfer. Limitierend für die Verwendung von AAVs sind ihre geringe Transportkapazität für genetisches Material (4 – 5 kb) und natürlich vorkommende Antikörper. Letztere sind beim Menschen hauptsächlich gegen AAV2, beim Hund gegen AAV6 und AAV8 gerichtet (VINGE et al., 2008; SLEEPER et al., 2011; RAPTI et al., 2012; HAMMOUDI et al., 2015).

Einige AAV Serotypen weisen einen kardialen Tropismus auf (VINGE et al., 2008; ZINCARELLI et al., 2008). In einem Vergleich der kardiotropen AAV-Serotypen 1,6,7,8 und 9 zeigte sich, dass AAV9 die stärkste und stabilste Expression in Maus- und Rattenherz liefert (BISH et al., 2008). Dies wurde auch mehrfach bestätigt (RINCON et al., 2015). Trotz des vielversprechenden Kardiotropismus des AAV9, kann es in gewissem Maß, unabhängig von der Applikationsart, auch zur Transduktion anderer Organe, wie z.B. der Leber kommen (FANG et al., 2012; RINCON et al., 2015). Eine dadurch erfolgende mögliche Schädigung dieser Organe stellt einen sicherheitsrelevanten Faktor dieses Vektors dar und sollte deshalb vor einem therapeutischen Einsatz gründlich untersucht werden.

Zur Verbesserung der kardialen Transduktion kann der AAV Serotyp mit einem gewebespezifischen Promoter und zusätzlich mit einer Verstärkersequenz kombiniert werden. In der vorliegenden Studie wurde ein Myosin-Leicht-Ketten (MLC260) Promotor mit einem Cytomegalievirus (CMV) als Verstärker gekoppelt und in das AAV9 Genom integriert.

Das daraus resultierende Konstrukt wird als AAV9-CMV/MLC260 bezeichnet.

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass der gentherapeutische Einsatz des Konstrukts AAV9-CMV/MLC-260 zu einer erfolgreichen Transduktion von Kardiomyozyten mit einer Langzeitexpression des gewünschten Transgens führt (PLEGER et al., 2011; VOLKERS et al., 2011; BANGERT et al., 2016). In unserem Fall wäre dies das calciumbindende Protein S100A1. Eine erfolgreiche kardiale Expression nach intravenöser AAV9-Injektion wurde ebenfalls bestätigt (INAGAKI et al., 2006; FANG et al., 2012).



### 3. Das calciumbindende Protein S100A1

S100A1 gehört zu der calciumbindenden S100-Proteinfamilie, die mit 25 derzeit bekannten Mitgliedern zur größten Subgruppe der Superfamilie der calciumbindenden EF-Hand Proteine gehört (MARENHOLZ et al., 2004; SEDAGHAT & NOTOPOULOS, 2008). Die S100 Proteine sind sehr klein (8 – 10 kDa) und liegen *in vivo* als Homodimere vor, wie in Abb.II.1a dargestellt (WRIGHT et al., 2005). Charakteristisch ist ihre Fähigkeit der Calciumbindung an den sogenannten EF-Hand-Motiven, die aus einer Helix-Loop-Helix Anordnung zusammengesetzt sind. Verbunden werden diese Regionen durch eine Scharnierregion, sog. *Hinge region* (DONATO, 1991; KRAUS et al., 2009).

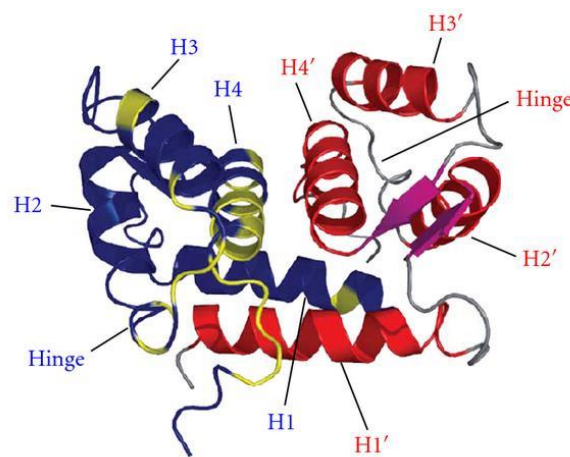


Abb.I.1a

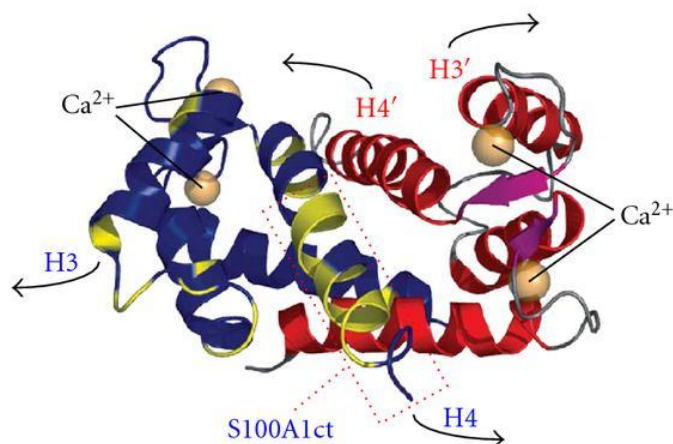


Abb.I.1b

**Abbildung II.1a + b: Dreidimensionale Struktur eines calciumbindenden S100A1 Dimers**

a) Zwei S100A1 Monomere (rot und blau) bilden ein kompaktes, antiparalleles Homodimer, hier dargestellt im  $\text{Ca}^{2+}$  freien Zustand; b) Durch die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (goldene Kugeln) an den EF-Hand Motiven kommt es zu einer Konformationsänderung der Tertiärstruktur, bei der sich Helix 3 und 4 nach außen bewegen und so die Hinge-Region und der C-Terminus freigelegt werden (H1-4: alpha-Helix 1-4; ct: C-Terminus; modifiziert nach (WRIGHT et al., 2005)).

Das Protein S100A1 wird am meisten im Myokard und dort in den Kardiomyozyten exprimiert (KATO & KIMURA, 1985; MARENHOLZ et al., 2004). Das Expressionsmuster ist dabei homogen, im linken Ventrikel ist die Konzentration an mRNA und Protein am höchsten (REMPPIS et al., 1996). Interessanterweise kommt es zu Veränderungen der S100A1 Expression bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz. Während bei der kompensatorischen Herzinsuffizienz eine erhöhte S100A1-Expression nachgewiesen werden kann (EHLERMANN et al., 2000), zeigt sich bei der chronischen Herzinsuffizienz eine massive Verringerung der Proteinexpression (REMPPIS et al., 1996; TSOPORIS et al., 2003; KRAUS et al., 2009).

Bei Hunden und Katzen konnte im fortgeschrittenen Stadium der Herzinsuffizienz das gleiche Phänomen nachgewiesen werden (GUPTA et al., 2009; SLEEPER et al., 2011).

S100A1 setzt an mehreren Stellen des Calciumstoffwechsels an und ist damit ein geeignetes Zielprotein für die Gentherapie. In der Systole kommt es durch die Interaktion mit dem Ryanodin Rezeptor 2 (RyR2) zu einem vermehrten  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (ER) in das Zytosol der Kardiomyozyten. In der Diastole stabilisiert S100A1 den RyR2, wodurch ein geringeres  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck resultiert (MOST et al., 2004; KETTLEWELL et al., 2005; VOLKERS et al., 2007). Zusätzlich kommt es zu einer gesteigerten Aktivität der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA2a) und dadurch zu einem vermehrten aktiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückstrom vom Zytosol in das ER (MOST et al., 2001; KIEWITZ et al., 2003). S100A1 agiert ebenfalls mit der mitochondrialen F1-ATPase und steigert dadurch deren Aktivität (BALABAN, 2002; BOERRIES et al., 2007; ROHDE et al., 2011; RITTERHOFF & MOST, 2012).

Vorangegangene *in vivo* Studien zeigen, dass sich bei S100A1-Knock out Mäusen mit induziertem Myokardinfarkt eine Herzinsuffizienz schneller manifestierte und sie eine signifikant kürzere Überlebenszeit hatten (MOST et al., 2006). Transgene Mäuse, deren Kardiomyozyten eine S100A1 Überexpression zeigten, wiesen dagegen nach induziertem Infarkt eine höhere Überlebensrate, sowie eine signifikante Verbesserung der systolischen und diastolischen Herzfunktion auf (MOST et al., 2003; MOST et al., 2006). Ein intrakoronarer, adenoviraler S100A1-Gentransfer wurde erfolgreich an Ratten mit einem 2 Stunden alten induzierten Myokardinfarkt durchgeführt. Die mit S100A1 behandelten Ratten

zeigten 1 Woche post op eine komplette Erhaltung der linksventrikulären Funktion. Dieser Effekt ist auf die Wirkung von S100A1 auf das gesunde Myokardgewebe zurückzuführen. Die Kontraktilitätsparameter und Calcium-Transienten (d.h. eine kurzzeitige Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration) der daraufhin isolierten Kardiomyozyten zeigten eine signifikante Erhöhung gegenüber den Kontrollgruppen (PLEGER et al., 2005).

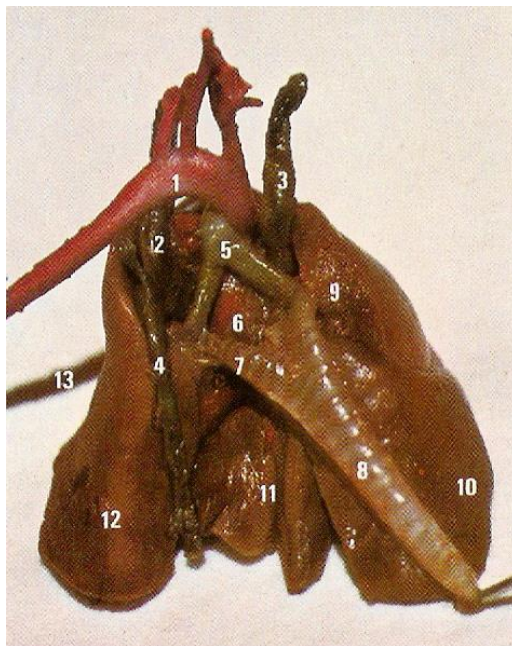
Durch einen intrakoronaren, adenoviralen S100A1-Gentransfer in insuffiziente Rattenkardiomyozyten konnte eine Wiederherstellung der Kontraktilität sowie eine Normalisierung des S100A1-Proteinlevels erreicht werden (MOST et al., 2004).

Aufbauend auf diesen Erkenntnissen scheint zur Behandlung der Herzinsuffizienz ein Therapieansatz vielversprechend, dessen Ziel die Wiederherstellung oder zumindest Erhöhung des S100A1-Expressionslevels in den Kardiomyozyten ist.

#### **4. Die Ratte als kardiovaskuläres Versuchsmodell**

Die Ratte wird häufig in der Herz-Kreislauf-Forschung verwendet und ist ein etabliertes Modell zur Prüfung von Toxizitäts- und Arzneimittelwirkung (SENATSKOMMISSION FÜR TIEREXPERIMENTELLE FORSCHUNG, 2004).

Zudem unterscheidet sich das Rattenherz in seiner funktionellen Anatomie nur geringfügig von der des menschlichen Herzens. Abgesehen von dem Größenunterschied der Herzen liegt ein weiterer Unterschied darin, dass bei der Ratte drei *Venae cavae* vorkommen (OLDS, 1984; SUCKOW, 2005). Es gibt eine *V.cava cranialis sinister*, eine *V.cava cranialis dexter* und eine *V.cava caudalis* (s.Abb.II.2).



- 1 *Aorta*
- 2 *V. cava cranialis sinister*
- 3 *V. cava cranialis dexter*
- 4 *V. cava caudalis*
- 5 *Truncus pulmonalis*
- 6 *Vv. pulmonales*
- 7 *Bronchus principalis*
- 8 *Trachea*
- 9 – 12 *Lunge*

**Abbildung II.2: Der Gefäßbaum dorsal des Rattenherzens** (modifiziert nach (OLDS, 1984))

In der vorliegenden Studie wurde die Ratte als Tiermodell verwendet, da damit bereits vielversprechende Studien im Bereich der kardialen Genforschung vorangegangen sind und es somit therapeutische Vergleichsdaten gibt (MOST et al., 2004; PLEGER et al., 2005; PLEGER et al., 2007). Für eine objektive Beurteilung des Gentransfers, im Hinblick auf die AAV9 Verteilung im Körper und eine daraus resultierende Risikobeurteilung, wurde die Studie an gesunden Ratten durchgeführt. Dadurch sollten Beeinträchtigungen des Gentransfers durch krankheitsbedingte Veränderungen im Kreislauf oder einzelner Organe ausgeschlossen werden.

## 5. Fragestellung und Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es zu überprüfen, ob die intravenöse Injektion von AAV9-CMV-MLC260-S100A1 bei gesunden Ratten als sichere und effektive Applikationsart bei der kardialen Gentherapie genutzt werden kann.

Mit Hilfe verschiedener Gewebeuntersuchungstechniken sollten die Verteilung des AAV9 und die Auswirkungen des systemischen intravenösen Gentransfers auf verschiedene Organsysteme untersucht werden. Aufgrund des derzeitigen Entwicklungsstadiums dieser Therapieform waren extrakardiale Proteinexpression und davon abzuleitende Effekte zu erwarten. Deshalb sollte insbesondere auf die funktionelle Beeinträchtigungen weiterer wichtiger Organe geachtet werden. S100A1 wurde wegen seines bereits aufgezeigten therapeutischen Potentials für das Myokard als Ziel-Protein ausgewählt.

Die vorliegende Arbeit wurde als kleine Pilotstudie angelegt, um die Durchführbarkeit des Applikationsansatzes und die methodische Aufarbeitung von Gewebeproben zu testen und dadurch einen erfolgreichen Gentransfer zu verifizieren. In diesem Rahmen sollte auch die Existenz einer Dosis-Wirkungsbeziehung anhand drei ansteigender Virus-Dosierungen von  $1 \cdot 10^{10}$ ,  $5 \cdot 10^{10}$  und  $1 \cdot 10^{11}$  und die AAV9 Biodistribution untersucht werden.

Dadurch ließe sich erstmalig darstellen, ob sich die AAV9-Verteilung sowie die S100A1-Expression in den ausgewählten Organen dosisabhängig verändern und ob sich dadurch relevante Sicherheitsrisiken ableiten lassen.

### **III. MATERIAL UND METHODEN**

Das vorliegende Tierversuchsvorhaben wurde durch das Regierungspräsidium Karlsruhe genehmigt, gemäß deutschem Tierschutzgesetz in der Fassung der Bekanntmachung vom 18.5.2006 (BGBl. I.S.1206, 1313), das zuletzt durch Artikel 3 des Gesetzes vom 4.7.2013 (BGBl I.S. 2182) geändert worden ist.

#### **1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

Es wurden insgesamt 12 männliche Sprague Dawley Ratten für die Untersuchungen verwendet. Das anfängliche Körpergewicht der Tiere lag durchschnittlich bei ca. bei 300 g. Die Tiere wurden in Dreiergruppen in Eurostandardkäfigen Typ IV (Tecniplast, Hohenpeißenberg) gehalten und hatten vor Versuchsbeginn eine Adaptionszeit von einer Woche.

Die Ratten befanden sich in einem Raum mit 16 – fachen Luftwechsel bei einer Raumtemperatur von 18 – 22 °C und 40 – 70 % Luftfeuchtigkeit. Das Licht wurde über einen zwölfstündigen Hell-Dunkelrhythmus gesteuert, bei einer maximalen Intensität von 60 Lux. Rod – 16A als Alleinfutter (LASvendi, Soest) und Wasser standen den Ratten ad libitum zur Verfügung.

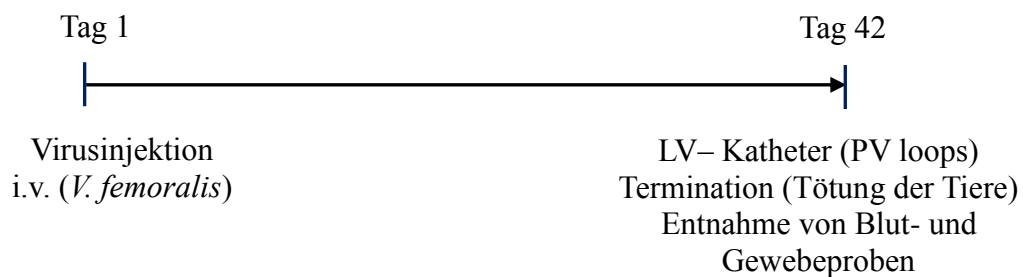
Die Haltung, sowie die Operationen und Untersuchungen wurden in den Räumen der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF) Heidelberg durchgeführt. Die finalen Untersuchungen sowie die Probenentnahme fanden in der Medizinischen Klinik III (Abteilung für Kardiologie, Angiologie und Pneumologie) des Universitätsklinikum Heidelberg statt.

## **2. Versuchsaufbau und Gruppeneinteilung**

Die Studie wurde an klinisch gesunden, männlichen Ratten durchgeführt.

An Versuchstag 1 wurde bei 12 Tieren eine intravenöse Injektion der Virus-Lösung mit AAV9-CMV/MLC260-S100A1 (Behandlung) bzw. mit einer NaCl-Lösung (Kontrolle), unter Anästhesie, durchgeführt. Die verwendeten Virus-Dosierungen basieren auf den Daten unserer Arbeitsgruppe und wurden so gewählt, dass ein relativ großer Dosis-Wirkungsbereich abgedeckt ist. Nach der intravenösen Injektion wurden die Ratten über 42 Tage genau überwacht. Es erfolgte eine tägliche adspektorische Kontrolle der Tiere durch die versuchsdurchführende Tierärztin sowie durch das Fachpersonal der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung (IBF Heidelberg). Dabei wurde auf den Allgemeinzustand, die Futter- und Wasseraufnahme, sowie das Verhalten der Tiere geachtet.

Nach diesem Zeitraum sollten durch den Gentransfer deutliche Veränderungen im Myokard nachgewiesen werden können. Zum Beispiel kann eine erhöhte Proteinexpression im Gewebe durch einen Western Blot nachgewiesen werden. Zur hämodynamischen Charakterisierung wurde bei den Tieren an Versuchstag 42, unter Anästhesie, eine linksventrikuläre Blutdruckmessung durchgeführt. Anschließend wurde ihnen Blut entnommen, um verschiedene Parameter der klinischen Chemie und der Gerinnung zu analysieren. Die Tiere wurden bei der Sektion durch Entfernung des Herzens getötet. Während der Sektion wurden Gewebeproben entnommen, um diese im Rahmen der Studie zu analysieren. Abb.III.1 zeigt den zeitlichen Verlauf der Studie. Die Einteilung der Gruppen mit der jeweils applizierten Virus-Dosis ist in Tabelle III.1 wiedergegeben.



**Abbildung III.1 Zeitlicher Ablauf der Studie**

Nach der Virusinjektion an Tag 1 wurden die finalen Untersuchungen an Tag 42 durchgeführt.

**Tabelle III.1: Gruppeneinteilung**

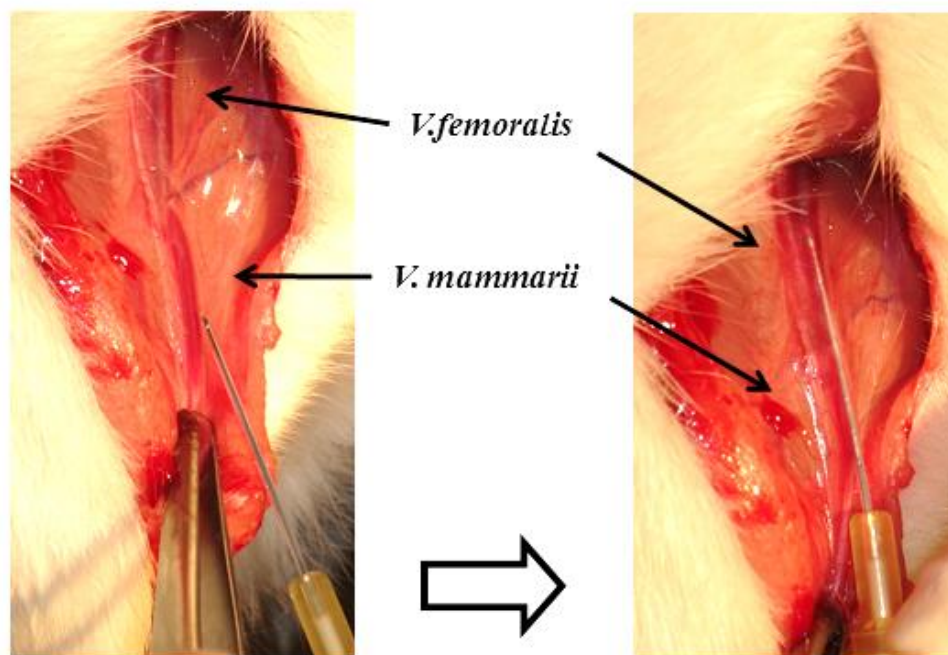
Gruppe	Dosis des Viruskonstruktes
<b>Gruppe 1</b> (n = 3)	NaCl-Injektion = Kontrollgruppe
<b>Gruppe 2</b> (n = 3)	<b><math>1 \cdot 10^{10}</math></b> AAV9-ds-CMV/MLC260 - S100A1
<b>Gruppe 3</b> (n = 3)	<b><math>5 \cdot 10^{10}</math></b> AAV9-ds-CMV/MLC260 - S100A1
<b>Gruppe 4</b> (n = 3)	<b><math>1 \cdot 10^{11}</math></b> AAV9-ds-CMV/MLC260 - S100A1



### 3. Versuchsdurchführung

#### 3.1 Virusinjektion/Gentransfer

*Prinzip: Die intravenöse Virusinjektion in die V.femoralis ist ein geeignetes Verfahren zur Applikation von AAVs in den systemischen Kreislauf der Ratte. Der Virus gelangt sicher in die V. femoralis und wird von dort in die V. cava caudalis weitergeleitet. Der Verlust an Virus ist minimal und auch die Gefahr eines Paravasats ist bei dieser Applikationsart gering gehalten.*



**Abbildung III.2: Schema der AAV9 – CMV/MLC260-S100A1 Virusinjektion**  
Legen eines Venenverweilkatheters in die V. femoralis für die Virusinjektion

Die Anästhesie der Ratten erfolgte über eine Inhalationsnarkose. Zur Einleitung wurde die entsprechende Ratte in eine luftdichte Kammer gesetzt und mit 5 % Isofluran und 1000 ml/min O<sub>2</sub> in Narkose versetzt. Die Narkoseerhaltung wurde mit 2 % Isofluran und 300 – 400 ml/min O<sub>2</sub> über eine Maske gewährleistet. Die Ratte wurde in Rückenlage mit Klebestreifen auf der Wärmeplatte (Minitüb, Tiefenbach) fixiert und über den Zwischenzehenreflex wurde sichergestellt, dass die Narkose tief genug ist. Um die Augen vor dem Austrocknen zu schützen wurde Augensalbe aufgetragen. Die Körpertemperatur wurde während des gesamten Eingriffs über ein Rektalthermometer überwacht und mittels Wärmeplatte konstant gehalten.

Es wurde ein 1 – 2 cm großer halbrunder Hautschnitt an der rechten Hintergliedmaße im Bereich des Leistenkanals mittig bis zum Knie mit der Metzenbaumschere gesetzt. Es folgte ein kleiner Schnitt ins Fettgewebe am dorsalen Schnitttrand und die stumpfe Freipräparation in Richtung *V. & A. femoralis*. Danach wurden die Faszien durchtrennt und die Gefäße freigelegt. Mit einem 3-0 Prolene Faden wurde der *M. externus obliquus abdominis* möglichst weit dorsal angeschlungen und der Faden mit Klebeband gespannt. Mit einer Klemme wurde der ventrale Schnitttrand straff nach kaudal gezogen um den Übergang der *V. mammarii* in die *V. femoralis* zu strecken. Dies erleichtert das Legen des Venenverweilkatheters.

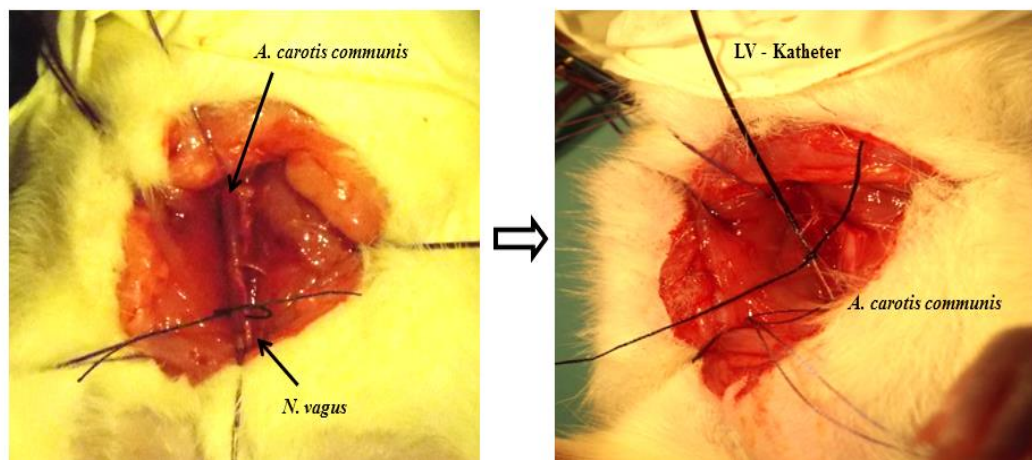
Der Venenverweilkatheter wurde vorsichtig über die *V. mammarii* in die *V. femoralis* vorgeschoben. Zuerst wurde eine 2 ml Spritze mit 0,9 % Kochsalzlösung aufgesetzt und aspiriert, um die Lage des Venenverweilkatheter im Blutgefäß noch einmal zu kontrollieren. Anschließend wurde die Virus-Lösung injiziert und mit ca. 0,5 ml 0,9 % Kochsalzlösung nachgespült. Bei der Injektion wurde darauf geachtet, dass in der Vene Verwirbelungen sichtbar waren.

Dann wurde der Venenverweilkatheter herausgezogen und die *V. mammarii* sofort mit einer anatomischen Pinzette abgedrückt. Nach ca. 1 Minute war die Blutung gestillt und es konnte die Hautnaht mit ca. 5 Einzelknopfnähten gesetzt werden. Der Nahtbereich wurde mit Povidon-Jod-Lösung desinfiziert. Nach dem Wundverschluss wurde die Narkose beendet.

In der ersten Woche nach dem Eingriff wurden die Tiere zweimal täglich von der versuchsdurchführenden Tierärztin und dem Fachpersonal des IBFs beobachtet und erhielten als Schmerztherapie eine Kombination aus 0,03 mg/kg KGW Buprenorphin (= 0,1 ml/kg KGW) und 5 mg/kg Carprofen (= 0,1 ml/kg KGW) mittels einer täglichen subkutanen Injektion.

### 3.2 Linksventrikulärer Druck-Volumen-Katheter

*Prinzip: Die linksventrikuläre Druck-Volumen-Messung ist eine anerkannte Methode, um die Herzfunktion zu beschreiben. Dabei wird ein 1,9 French großer Katheter der Firma Transonic Sciense über die Arteria carotis comunis in den linken Ventrikel des Herzens eingebracht. An der Spitze des Katheters befinden sich ein Drucksensor, sowie ein System zur Volumenbestimmung. Dadurch kann die kardiale Funktion in Form einer Druck-Volumen-Kurve beschrieben werden. Mittels dieser Kurve kann die optimale Lage im linken Ventrikel verifiziert werden (siehe Abb.III.4).*



**Abbildung III.3: Linksventrikuläre Druck – Volumenmessung**

Links: Darstellung des freipräparierten Gefäß-Nervenbündels bestehend aus *A.carotis communis* und *N.vagus*

Rechts: Positionierter, fixierter LV – Katheter in der *A.carotis communis*

Aufgrund der Durchführung dieser Untersuchung in einem anderen Gebäude wurde eine andere Form der Anästhesie gewählt. Die Ratten wurden mit einer Kombination aus Ketamin (100 mg/kg KGW) und Xylazin (5 mg/kg KGW) über eine intraperitoneale Injektion in Narkose gelegt. Sie wurden dann in Rückenlage gebracht und über den Zwischenzehenreflex wurde sichergestellt, dass die Narkose tief genug ist. Um die Augen vor dem Austrocknen zu schützen, wurde Augensalbe aufgetragen.

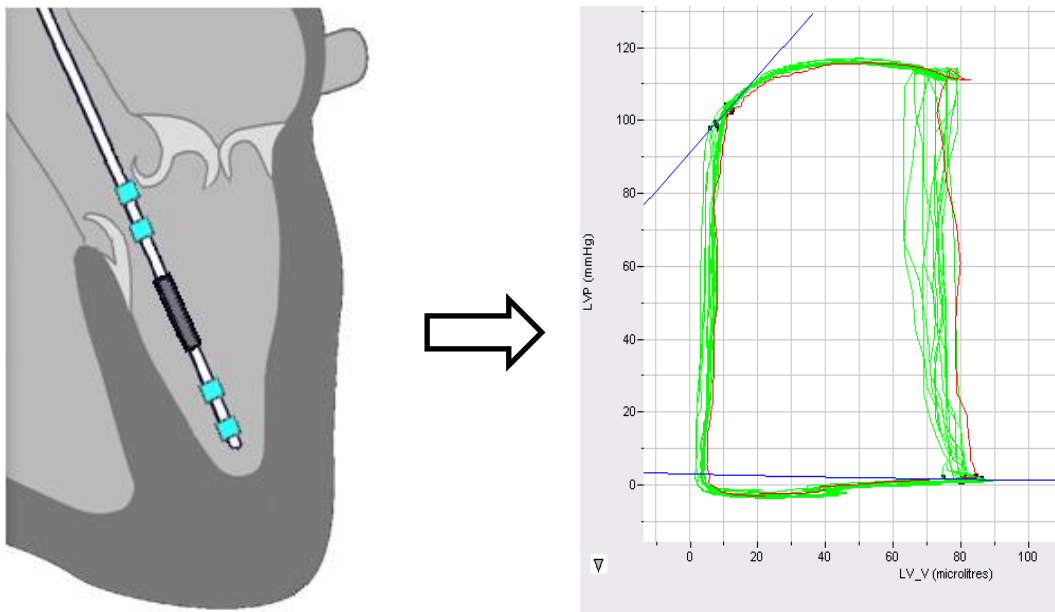
Als Zugang zum Operationsgebiet wurde ein ventraler medialer Hautschnitt von der *Apertura thoracis cranialis* bis zu den palpierbaren *Glandulae mandibularis* gesetzt. Es erfolgte eine stumpfe Trennung der *Glandulae* sowie der einzelnen Muskelstränge voneinander. Der *M. sternomastoideus* wurde mit je einem

kranialen und einem kaudalen Haltefaden auf der Arbeitsplatte fixiert, um ein besseres Sichtfeld zu erhalten. Der *M. sternohyoideus* wurde mit einem Haltefaden versehen und nach lateral gezogen. Nachdem die *A. carotis* vorsichtig aus der Karotisscheide herauspräpariert wurde, wurde sie kurz unterhalb der Bifurkation mit einem 4-0 Safil Faden ligiert und an den Fadenenden eine Klemme befestigt. Soweit kaudal wie möglich wurde die *A. carotis* ebenfalls mit einem 4-0 Safil Faden angeschlungen, um das spätere Legen des Katheters zu erleichtern. Dieser Faden musste auf Spannung gebracht werden, damit kein Blut mehr einströmen konnte. Zur späteren Fixierung des Katheters wurde ein weiterer Faden unterhalb der Arterie positioniert. Durch einen kleinen Einschnitt in die *A. carotis* nahe an der Bifurkation, aber noch unterhalb der Ligatur, wurde der Zugang für den Druck-Volumen-Katheter geschaffen.

Nach dem Einführen des Katheters wurde der Faden um Gefäß und Katheter fest angezogen und der kaudale Haltefaden gelockert, so dass der Katheter weiter vorgeschoben werden konnte. Der Katheter wurde vorgeschoben bis ein Widerstand durch die Aortenklappe spürbar wurde. Dann wurde auf eine Öffnungsphase der Klappen gewartet, um den Katheter in den linken Ventrikel vorzuschieben.

Das Vorschieben des Katheters wurde mit Hilfe der dabei entstehenden und aufgezeichneten Druckkurven überwacht. Die in Abb.III.4 dargestellte Druck-Volumen-Kurve zeigt die ideale Position des Druck-Volumen Katheters im linken Ventrikel. In dieser Position wurde der Katheter durch den Haltefaden fixiert.

Die erhaltenen Daten wurden mit der Software LabScribe3 aufgenommen und ausgewertet.



**Abbildung III.4: Schemazeichnung der idealen Position des Druck-Volumen Katheters im linken Ventrikel (zur Verfügung gestellt von der Firma Transonic) und ein Beispiel für die dazugehörige Druck-Volumen-Kurve**

Nach der Speicherung der Druck – Volumen – Kurven auf dem PC wurde für die Blutentnahme ein Kunststoff-Katheter (0,58 mm Innendurchmesser und 0,96 mm Außendurchmesser) in die *V. femoralis* gelegt. Dafür wurde die *V. femoralis* wie bei der Virusinjektion freipräpariert, allerdings an der linken Extremität. Die *A.* und *V. femoralis* wurden vom umliegenden Bindegewebe befreit und die *V. femoralis* oberhalb des Abganges der *V. mammaria* mit 4-0 Safil-Faden ligiert. Oberhalb der gedachten Einschnittstelle wurde die *V. femoralis* angeschlossen und der Blutfluss dadurch unterbrochen. Ein zusätzlicher Faden zur Fixierung des Katheters wurde unterhalb der Vene positioniert. Mit einer Schere wurde ein kleiner Schnitt gesetzt und der Katheter hineingelegt. Zum Verschieben wurde der Haltefaden gelockert und dann der Faden zur Fixierung festgezogen. Anschließend wurden ca. 2,6 ml Blut mit einer 3 ml Einmalspritze für die Messung von Parametern der klinischen Chemie (in Li - Heparin - Monovetten) sowie der Blutgerinnung (in Citrat – Monovetten) entnommen.

Die Blutproben wurden nach der beendeten Sektion 15 min lang bei 4 °C und 4500 rpm zentrifugiert. Das überstehende Plasma wurde in Polystyrolröhrchen pipettiert und in einer, mit Eis gekühlten, Styroporbox in das Analysezentrum am Universitätsklinikum Heidelberg zur Analyse transportiert.

Folgende Parameter wurden dort analysiert:

Klinische Chemie (in Heparinplasma):

Natrium, Kalium, Calcium, Chlorid, Kreatinin, Harnstoff, ALT (Alanin-Aminotransferase), AST (Aspartat-Aminotransferase), Albumin

Gerinnung (in Citratplasma):

Quick, aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit), Fibrinogen

Die Auswahl dieser Blut-Parameter ebenso wie die, der euthanasierten Ratte, entnommenen Organe ist auf die Fragestellung dieser Arbeit zurückzuführen. Dadurch sollten Auswirkungen der systemischen Virus-Applikation auf den Wasser-Elektrolythaushalt, die Niere, die Leber und auf die Blutgerinnung aufgezeigt werden. Die Gewebeuntersuchung der entnommenen Organe (Herz, Leber, Niere, Milz und Gehirn) sollten wichtige Erkenntnisse über die Verteilung des applizierten Viruskonstruktes im Körper liefern.

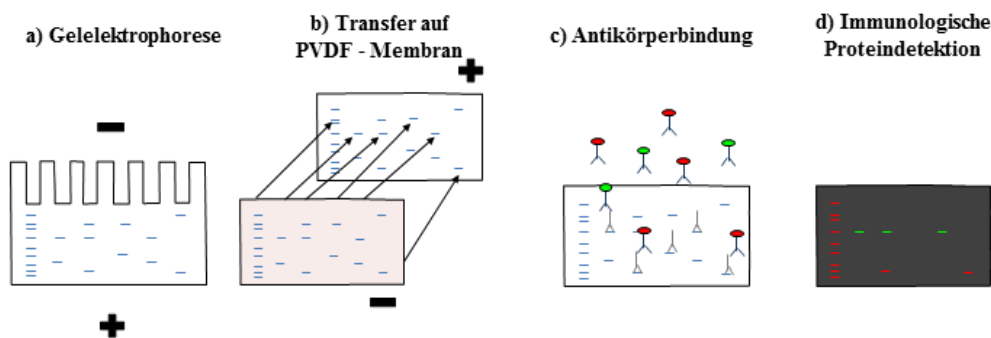
Alle Versuchs- und Kontroll-Ratten wurden im Zuge der Sektion durch die Entfernung des Herzens getötet. Bei der Sektion wurden der linke und rechte Ventrikel des Herzens, der *Lobus sinister lateralis* der Leber, die linke Niere und die Milz entnommen und in mehrere Gewebeproben aufgeteilt.

Der linke und rechte Ventrikel wurde senkrecht in annähernd gleichgroße Stücke geschnitten. Vom *Lobus sinister lateralis* der Leber wurden vom kaudalen Rand ausgehend 4-5 gleichgroße Stücke abgetrennt. Die linke Niere wurde in gleichgroße Stücke geschnitten. Es wurde darauf geachtet, dass nur Stücke mit Nierenrinde und Nierenmark weiterverwendet wurden. Die Milz wurde in gleichgroße Stücke geschnitten. Zusätzlich wurde von einem Tier pro Gruppe das Gehirn entnommen und entlang der *Fissura longitudinalis cerebri* geteilt. Anschließend wurden beide Gehirnhälften waagerecht geteilt, so dass 4 annähernd gleich große Gewebestücke entstanden.

Die Gewebeproben wurden entsprechend der weiteren Untersuchungsverfahren bearbeitet und konserviert. D.h. sie wurden entweder direkt in flüssigem Stickstoff Schock gefroren und anschließend bei -80 °C gelagert oder über Nacht in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 4 % Formaldehyd gelegt, am nächsten Tag in 70 % Ethanol überführt und dann bei 4 – 8 °C gelagert.

### 3.3 Western Blot

*Prinzip: Für den spezifischen Protein-Nachweis in den Gewebeproben der entnommenen Organe zur Überprüfung der erfolgten Translation wurde die Western Blot Methode angewendet. Es wurden die Proteine aus Homogenaten der unterschiedlichen Gewebestücke (Herz, Leber, Niere, Milz) mit Hilfe einer Polyacrylamid – Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend ihrer Größe in Proteinbanden aufgetrennt. Als nächster Schritt wurden die Proteinbanden durch einen Elektrotransfer auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) übertragen, bevor sie dort mit einem spezifischen Erstantikörper identifiziert und mittels eines Zweitantikörpers über einen Infrarot-Scanners sichtbar gemacht werden konnten (= Immunologische Proteindetektion).*



**Abbildung III.5: Schema zum Ablauf eines Western Blots:**

a) Nach Homogenisierung der Gewebe wurden die Proteine in einer Gelelektrophorese nach deren Größe aufgetrennt, b) Durch einen Transfer wurden die Proteinbanden auf eine PVDF-Membran übertragen, c) Bindung des spezifischen Erstantikörper an Protein und Markierung durch einen Zweitantikörper mit Fluoreszenz-Farbstoff, d) Durch einen Infrarot-Scanner konnten die entsprechenden Proteine sichtbar gemacht werden

#### 3.3.1 Gewebeaufreinigung

Die Homogenisierung der Gewebeproben wurde in einem Extraktionspuffer und auf Eis durchgeführt. In vorausgegangenen Versuchen (Daten nicht veröffentlicht) wurden die idealen Mengen an Organewebe und Extraktionspuffer (siehe Tab.III.2), sowie die gewebspezifischen Programme der Kugelmühle zur Homogenisierung (siehe Tab.III.3), erarbeitet. Sie haben sich für die nachfolgenden Untersuchungen bewährt. Die spezifische Menge Organewebe wurde mit einer Feinwaage abgewogen und mit einer Skalpellklinge zerkleinert bevor es zum vorgelegten Extraktionspuffer gegeben wurde (siehe Tab.III.2). Der Extraktionspuffer wurde in Spezialröhrchen mit 3 großen (Durchmesser 2,5 mm)

und 4 kleinen (Durchmesser 1 mm) Kugeln vorgelegt. Die Gewebestücke wurden in diesen Spezialröhrchen mittels einer Kugelmühle entsprechend einem festgelegten Programm (siehe Tab.III.3) durch die Kugeln homogenisiert. Vom Homogenat wurden ca. 1,5 ml in Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C 15 Minuten lang mit 14000 rpm zentrifugiert. Der dadurch gewonne Überstand wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C im Gefrierschrank gelagert. Vorher wurde noch für die Proteinbestimmung 5 µl des Überstands entnommen und in 45 µl gekühlten Extraktionspuffer überführt.

**Tabelle III.2: Organgewicht und Volumen des Extraktionspuffers**

Organ	Gewicht [mg]	Volumen Extraktionspuffer [µl]
<b>Herz</b>	35	800
<b>Leber</b>	35	1000
<b>Niere</b>	60	800
<b>Milz</b>	35	800
<b>Gehirn</b>	70	1000

**Tabelle III.3: Einstellungen für die Peqlab Kugelmühle zur Homogenisierung unterschiedlicher Organgewebe-Proben:** Die angegebenen organspezifischen Programme wurden nacheinander gestartet

Organ	Schüttelgeschwindigkeit [rpm]	Dauer des Schüttelintervalls [sec]	Wdh. eines Intervalls	Pause zw. Intervallen [sec]
<b>Herz</b>	6000	30	1 x	5
	6500	20	2 x	5
<b>Leber</b>	5000	10	2 x	5
	5500	30	1 x	5
<b>Niere / Milz</b>	6000	30	1 x	5
	5500	30	1 x	5
<b>Gehirn</b>	5000	15	2	10



### 3.3.2 Proteinbestimmung

Um eine gleichmäßige Beladung der Gelbahnen zu gewährleisten, wurde bei den vorher bearbeiteten Gewebeproben aller Ratten eine Proteinbestimmung mittels DC Protein Assay durchgeführt.

Dafür wurden 50 µl Proben Aliquots (1:10 Verdünnung), 250 µl Reagenz A (alkalische Kupfertrarat-Lösung), 5 µl Reagenz S (Detergens) und 2 ml Reagenz B (verdünnte Folin-Reagenz) in ein 5 ml Reagenzglas pipettiert und mittels eines Vortex - Schüttlers gemischt. Als Nullwert wurde eine 50 µl Probe Extraktionspuffer verwendet.

Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt. Die Proteinkonzentrationen in mg/ml der einzelnen Proben konnte mit Hilfe einer Standardgeraden errechnet werden.

Die aufzutragende Proteinmenge des linken und rechten Ventrikels betrug 65 µg, die der anderen Organe 70 µg. Diese Proteinmengen hatten sich bei früheren Versuchen bereits bewährt.

Mit Hilfe der errechneten Proteinkonzentrationen der Gewebeproben und der aufzutragenden Proteinmenge konnte das benötigte Volumen der einzelnen Proben für den Western Blot berechnet werden.

### 3.3.3 Western Blot

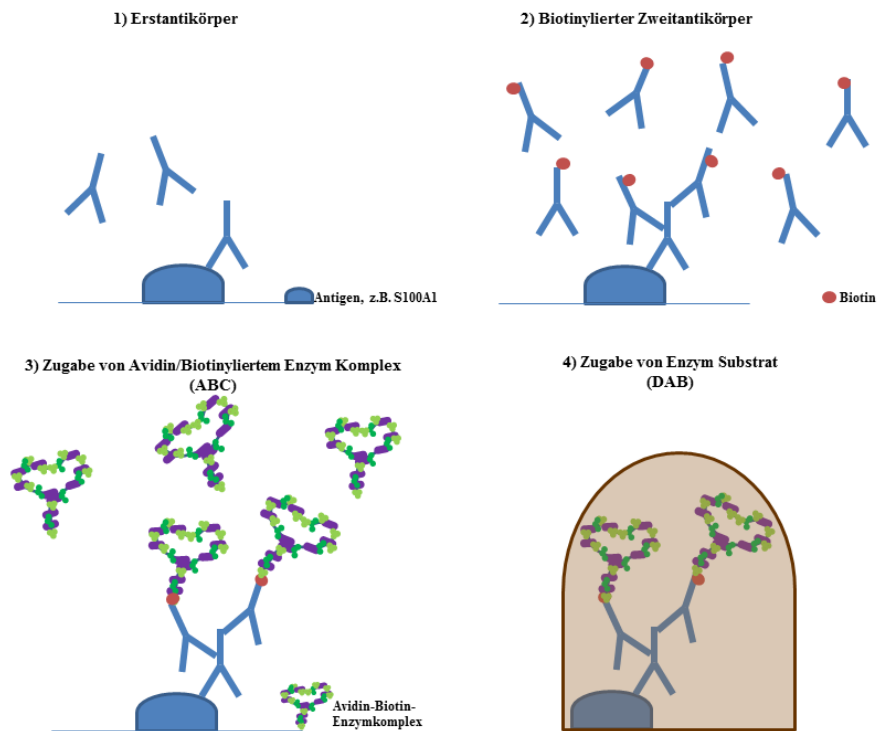
Als Vorbereitung für die Auftrennung der Proteine in der Gelelektrophorese wurde den Proben 3 µl des Ladepuffer (12 % Sodiumdodecylsulfat/SDS, 0,3 % Bromphenolblau, 60 % Glycerol, 0,15 % Mercaptoethanol, 300 mM TRIS-HCl, pH 6,8) zugegeben und 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Die vorbereiteten 4 – 20 % igen Tris-Glycin-Gele (Anamed, Gros-Bieberau) wurden in eine Kammer (XCell SureLock System, Thermo Scientific, Braunschweig) eingesetzt und die benötigten Kathoden- (0,1 M Taurin, 0,1 M TRIS, 0,1 % SDS) und Anodenpuffer (0,1 M TRIS, pH 8,6) eingefüllt. Die Geltaschen wurden mit einem maximalen Volumen von 22 µl und einer Proteinmenge von 65 – 70 µg beladen. Die Elektrophorese wurde bei einer Stromspannung von 80 Volt für 15 Minuten und anschließend bei 100 Volt für weitere 75 Minuten durchgeführt.

Anschließend wurde das Gel entnommen und in einer Tankblotkammer erfolgte der Protein Transfer auf eine PVDF-Membran bei einer Spannung von 50 Volt und unter Verwendung des Transferpuffers (20 % Methanol, 15 mM Taurin, 15 mM TRIS) in einem Zeitraum von 2 Stunden. Nach dem Transfer wurde die Membran in einer Schale drei Mal mit TBS-Tween Waschpuffer (25 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween-20) gewaschen und daraufhin 1 Stunde mit I-Block (1 g I-Block, 500 ml TBS Tween Puffer) inkubiert. Der Erstantikörper wurde in entsprechender Verdünnung (S100A1- 1:1000 und GAPDH- 1:10000) mit Blocking Puffer (Licor, Bad Homburg) vorbereitet. Die Inkubationszeit der Membran mit dem Erstantikörper betrug mindestens 12 Stunden. Die Schale mit der Membran befand sich über Nacht auf einem Schüttler um sicherzustellen, dass die Membran komplett vom Erstantikörper bedeckt wurde.

Vor der Zugabe des fluoreszenzgekoppelten Zweitantikörpers mit der Verdünnung 1:10000 wurde die Membran fünf Mal mit TBS-T gewaschen. Es wurde darauf geachtet, dass die Membran mit dem Zweitantikörper lichtgeschützt bei Raumtemperatur für 1 Stunde inkubiert wurde, bevor sie zuerst fünf Mal mit TBS-T und dann fünf Mal mit TBS gewaschen wurde. Für die weitere Lagerung wurde die Membran in TBS (25 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) eingelegt. Der Scan der Membran wurde mit dem Odyssey CLX durchgeführt und mit Hilfe der dazugehörigen Licor Image Studio Software ausgewertet.

### 3.4 Immunhistochemie

*Prinzip: Um S100A1 Protein in Gewebeschnitten aus dem Herzen sichtbar zu machen und, um dessen Anteil im Gewebe, sowie die Verteilung zu analysieren, wurde die Methode der Immunhistochemie gewählt. Hierbei konnten die Proteine mit Hilfe von biotinylierten Antikörpern sichtbar gemacht werden (Abb.III.6).*



**Abbildung III.6: Schema zum Ablauf der immunhistochemischen Detektion des S100A1 - Proteins in Gewebeschnitten:**

1) Bildung eines Antigen- Erstantikörper-Komplexes, der Erstantikörper wurde spezifisch für das entsprechende Antigen ausgesucht 2) Die biotinylierten Zweitantikörper waren gegen die artspezifischen Immunglobulinketten des Erstantikörpers gerichtet, 3) Bindung des Avidin-Biotin-Enzymkomplexes an den Antigen-spezifischen Erstantikörper über den biotinylierten Zweitantikörper. Durch die sehr starke Bindung zwischen Avidin und Biotin konnte die Gefahr von Auswaschungen verringert werden, 4) Durch die Zugabe von 3,3'Diaminobenzidin (DAB) kann der Avidin-Biotin-Enzymkomplex und damit auch das Antigen sichtbar gemacht werden.

#### 3.4.1 Organeinbettung in Paraffin

Nach der Organentnahme wurden Gewebestücke des linken und rechten Ventrikels zur Fixierung über Nacht in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 4 % Formaldehyd gelegt, am nächsten Tag in 70 % Ethanol überführt und im Anschluss bei 4 – 8 °C gelagert.

Zur weiteren Verarbeitung wurden die einzelnen Gewebestücke in Einbettkassetten umgelagert und durch Zusatz aufsteigend konzentrierten Alkohols (2 x 96 % EtOH, 2 x 99 % EtOH) entwässert. Der Alkohol wurde dann mit Xylol entfernt und die Einbettkassetten wurden für 3 Stunden in flüssiges Paraffin gelegt. Die Gewebestücke waren vorher so in Metallschälchen positioniert worden, dass die zu schneidende Fläche Richtung Boden zeigt und wurden dann mit heißem Paraffin übergossen. Der Deckel der Einbettkassette wurde als Blockträger auf das Metallschälchen gelegt und mit Paraffin befestigt. Zur Abkühlung wurden die Paraffinblöcke über Nacht bei -20 °C gelagert und nach Aushärtung mit einer Skalpellklinge aus dem Metallschälchen gelöst.

### 3.4.2 Herstellung von Paraffin-Gewebeschnitten



Abbildung III.7: Mikrotom mit eingespanntem Paraffinblock

Das Schneiden der Paraffinblöcke in 4 µm dicke Gewebeschnitte wurde mit Hilfe eines Mikrotoms durchgeführt. Die Paraffinblöcke wurden vorher auf Eis gelagert, um eine bessere Schnittfähigkeit zu erhalten. Die Halterung der Paraffinblöcke wurde knapp oberhalb der Schnittebene der befestigten Klinge in Stellung gebracht (siehe Abb.III.7). Es befand sich direkt neben der Klinge ein Wasserbad, um die Schnitte aufzufangen. Dann wurden, sofern möglich, 3 – 4 Schnitte am Stück geschnitten und aus dem Wasserbad mit Raumtemperatur mit Hilfe eines Objektträgers und eines feuchten Pinsels in ein ca. 50 °C warmes Wasserbad überführt. Der Gewebeschnitt wurde so geglättet. Die fertigen Schnitte wurden mit Objektträgern (Superfrost plus, Thermo Scientific, Braunschweig) aufgenommen und mit dem Pinsel richtig positioniert. Das überschüssige Wasser wurde abgeklopft und die Objektträger trockneten bei Raumtemperatur.

#### **3.4.3 Entparaffinierung und Rehydratation**

Die Objektträger wurden für 15 Minuten in einen 60 °C warmen Inkubationsschrank gestellt, um eine komplette Trocknung sicherzustellen. Dann wurden sie mit Hilfe von Xylol entparaffiniert und durch Alkohol in absteigender Konzentration (2 x 100 % EtOH, 1 x 90 % EtOH, 1 x 70 % EtOH, 1 x dH<sub>2</sub>O) rehydriert.

#### **3.4.4 Färbung**

Die Objektträger wurden in einer Citratpuffer – Lösung in einem Mikrowellengerät für 3 x 3 Minuten erwärmt. Dabei war darauf zu achten, dass der Puffer nicht zu kochen beginnt. Die Abkühlung der Objektträger erfolgte bei Raumtemperatur bevor sie dann mit deionisiertem Wasser gewaschen wurden. Anschließend wurden sie vorsichtig abgetrocknet und die Gewebestücke mit einem Fettstift (PapPen, Sigma-Aldrich, Schnellendorf) umrandet bevor sie wieder mit deionisiertem Wasser gewaschen wurden. Es folgten die Inkubation in 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 15 Minuten und 3 Waschgänge mit PBS.

1. Antikörper: Die Objektträger wurden vorsichtig abgetrocknet und in einer feuchten Kammer mit Blocking Serum (Vectastain Universal Elite ABC Kit) für 20 Minuten inkubiert. Das Blocking Serum wurde entfernt und die vorher angesetzte Erstantikörper - Verdünnung (S100A1 – 1:500; IgG - 1:1000) auf die Gewebestücke pipettiert. Die Inkubation in der feuchten Kammer wurde bei 4 °C

und über Nacht durchgeführt.

2. Antikörper: Die Objektträger wurden vier Mal 5 Minuten lang mit PBS gewaschen bevor sie in der feuchten Kammer mit verdünnter biotinylierter Zweitantikörper-Lösung für 30 Minuten inkubiert wurden. In dieser Zeit wurde die ABC-Lösung vorbereitet. Die Objektträger wurden vier Mal 5 Minuten lang mit PBS gewaschen, abgetrocknet und bei Raumtemperatur für 30 Minuten mit der ABC-Lösung inkubiert. Es folgten 4 weitere Waschgänge mit PBS von je 3 Minuten Dauer, eine erneute Trocknung und die Inkubation mit DAB. Die ideale Inkubationszeit für die DAB-Färbung wurde im Voraus mit einem Gewebeschnitt bestimmt, der eine gute S100A1 Expression zeigte. Sie betrug 1,05 Minuten. Die Objektträger wurden zwei Mal 3 Minuten lang mit Leitungswasser gewaschen bevor Mayer's Hämatoxylin (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) zur Kern - Gegenfärbung für 6 Minuten auf die Gewebeschnitte pipettiert wurde.

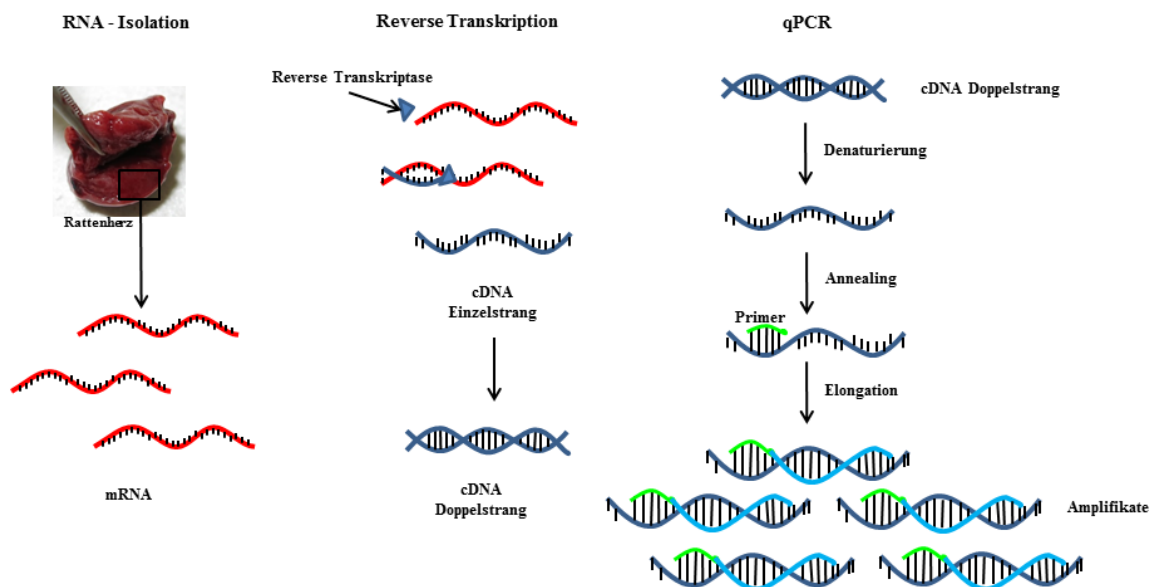
Die Objektträger wurden in einer Glas Küvette für 5 Minuten unter fließendes Leitungswasser gestellt. Die Seiten der Objektträger mit den Gewebeschnitten zeigten dabei von dem Wasserfluss weg, damit sie nicht heruntergespült werden konnten. Es folgten die Dehydratation mit Alkohol in aufsteigender Konzentration (1 x 70 % EtOH, 1 x 90 % EtOH, 2 x 100 % EtOH, 2 x Xylol), die Auftragung des Eindeckmediums (Eukitt, Sigma-Aldrich, Schnelldorf) zur Fixierung und das Auflegen eines Deckglases.

Die Gewebeschnitte wurden mittels Lichtmikroskop in 4-, 10- und 40- facher Vergrößerung dargestellt und fotografiert.

Die Fotos wurden anschließend mit der Software ImageJ analysiert.

### 3.5 Reverse Transkriptase – Polymerase – Kettenreaktion (RT-PCR)

*Prinzip: Um das Transkriptionsprodukt der Gene, die Messenger-RNA ( mRNA ), zu untersuchen und damit eine erfolgreiche Transkription nachzuweisen, wurde die RT-PCR verwendet (Abb.III.7). Hierbei wurde die, aus Gewebestücken, isolierte RNA in komplementäre DNA, sogenannte cDNA umgeschrieben. Im Anschluss daran erfolgten eine Amplifikation der DNA mit Hilfe von spezifischen Primern und eine relative Quantifizierung über die Messungen eines Fluoreszenzfarbstoffes in der exponentiellen PCR-Phase. Die Zunahme der Fluoreszenz ist dabei proportional zur Menge an PCR-Produkten und kann deshalb als Parameter verwendet werden.*



**Abbildung III.8: Schema zum Ablauf der RT-PCR**

Zuerst wurde die mRNA aus dem entsprechenden Organewebe (als Beispielorgan ist hier ein Rattenherz dargestellt) isoliert. Diese wurde dann im Prozess der Reversen Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben. Mit Hilfe spezifischer Primer konnten im Rahmen der Polymerasen Kettenreaktion die gewünschten DNA-Sequenzen vervielfältigt werden.

### 3.5.1 Gewebeaufreinigung und RNA Isolation

Die Gewebeaufreinigung wurde mit den Reagenzien des Qiagen RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit und auf Eis durchgeführt.

Pro Probe wurden 300 µl RLT Puffer benötigt. Dieser war vorher mit Beta-Mercaptoethanol (10 µl pro 1 ml RLT Puffer) versetzt worden. Es wurden je Gewebestück ca. 30 mg in einer Einmal-Wägeschale mit einer Feinwaage abgewogen und mit Hilfe einer Skalpellklinge darin zerkleinert, bevor es in die 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wurde. Zu dem bearbeiteten Gewebe wurden je 3 x 3 mm große Keramikugeln und je 300 µl RLT Puffer zugegeben.

Die Homogenisierung erfolgte mit Hilfe der Kugelmühle durch 3 x 30 Sekunden mit 6500 g. Zwischen den Durchgängen wurden die Proben jeweils für 5 Minuten auf Eis gestellt. Zur Reduzierung des Schaums wurden die Proben bei 10000 g für 1 Minute zentrifugiert und anschließend je 590 µl RNase-freies Wasser und 10 µl Proteinase K hinzugefügt. Durch hoch- und runter pipettieren wurde die Probe gründlich mit den anderen Bestandteilen vermischt.

Die RNA Isolation erfolgte nach dem Protokoll des Qiagen RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit. Zur Elution der RNA von der Säule wurden 30 µl Nuklease-freies Wasser hinzugegeben.

### 3.5.2 RNA Quantifizierung

Die Quantifizierung der RNA wurde spektrometisch mit dem NanoDrop durchgeführt. Für die Messung wurden 2 µl Probe benötigt. Die Ratio  $A_{260}/A_{280}$  der gemessenen Proben lag bei 1.9 – 2.3.

### 3.5.3 Reverse Transkription

Für die Umwandlung von RNA in komplementäre DNA wurde 1 µg pro Probe pro Well verteilt und Nuklease-freies Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 15 µl hinzugefügt.

Zuerst wurde der iScript Master Mix angesetzt, dafür wurden 4 µl 5x iScript Reaktion Mix und 1 µl iScript Reverse Transkriptase pro Probe vermischt und zu der vorher aufgetragenen RNA-Probe hinzugegeben. Das Gemisch wurde kurz herunterzentrifugiert und dann nach folgendem Protokoll (siehe Tab.III.4) in dem PCR-Cycler inkubiert.



**Tabelle III.4: Reaktionsprotokoll mit der Reversen Transkriptase**

Temperatur	Dauer
25 °C	5 Minuten
42 °C	30 Minuten
85 °C	5 Minuten
10 °C	unendlich oder alternativ: Lagerung bei -20 °C

### 3.5.4 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Um die Amplifizierung der gewünschten DNA-Fragmente durchführen zu können, wurde ein Master Mix (Tab.III.5) angesetzt und zu jeder Probe dazugegeben. Die verwendeten Primer sind in Tab.III.6 zusammengefasst. Die Proben waren vorher bereits in die Reaktionsgefäße einer 96 - well Platte pipettiert worden. Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt und zentrifugiert, damit sich die Proben auch am Boden der Platte befanden und die Luftblasen entfernt werden konnten bevor sie in den PCR Cyclyer gestellt wurde.

**Tabelle III.5: PCR Reaktionsansatz (Master Mix)**

Bestandteil	Volumen
iQ SYBR Green Supermix (2x)	10 µl
Forward Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
Reverse Primer (10 pmol/µl)	0,5 µl
cDNA	2 µl (50 ng/µl)
Nuklease-freies Wasser	7 µl
<b>PCR - Reaktionsansatz</b>	<b>20 µl</b>

**Tabelle III.6: Verwendete Primer (alle von der Firma MWG):**

Primer	Ziel - Gen	Sequenz
<b>rHPRT1 for 3</b>	Endogenes HPRT1 der Ratte	CCAGCGTCGTGATTAGTGAT
<b>rHPRT1 rev 3</b>	Endogenes HPRT1 der Ratte	AGAGGGCCACAATGTGAT
<b>rS100A1 2 For</b>	Endogenes S100A1 der Ratte	TGAGCAAGAAGGAGCTGAAA
<b>rS100A1 2 Rev</b>	Endogenes S100A1 der Ratte	CACCAGCACAACAACTCCT
<b>CMVMLC260-IgF</b>	Humanes S100A1 des AAV9 Konstrukts	TGTCCACTCCCAGTTCAATTAC
<b>S100A1 vt2.0 Rev</b>	Humanes S100A1 des AAV9 Konstrukts	AACACGTTGATGAGGGTCTC
<b>r+h S100A1 For 1</b>	Endogenes und humanes S100A1	ATGGGCTCTGAGCTGGAGAC
<b>r+h S100A1 Rev 1</b>	Endogenes und humanes S100A1	GCCACTGTGAGAGCAGCCAC

Die Programmierung des PCR-Cyclers gewährte unterschiedliche Temperatur-Schritte:

- 1) 3 min bei 95 °C: Aktivierung der Taq-Polymerase
- 2) 15 sec bei 95 °C: Initiale thermische Denaturierung der DNA; hierbei werden die DNA Stränge voneinander getrennt
- 3) 1 min bei 60 °C: Annealing und Elongation in einem Schritt; hierbei können die Primer an die DNA anlagern und die Polymerase synthetisiert einen komplementären DNA-Strang

Nach einmaliger initialer Denaturierung wurden insgesamt 40 Amplifikationszyklen der Schritte 2) und 3) durchgeführt. Anschließend wurde bei den Proben direkt eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Dabei wurden sie zuerst auf 55 °C abgekühlt und dann in 0,5 °C Schritten bis 95 °C wieder erwärmt. Dabei wurden die Amplifikate bei ihrer spezifischen Schmelztemperatur denaturiert. Gleichzeitig erfolgte eine kontinuierliche Messung der SYBR-Green Fluoreszenz gemessen.

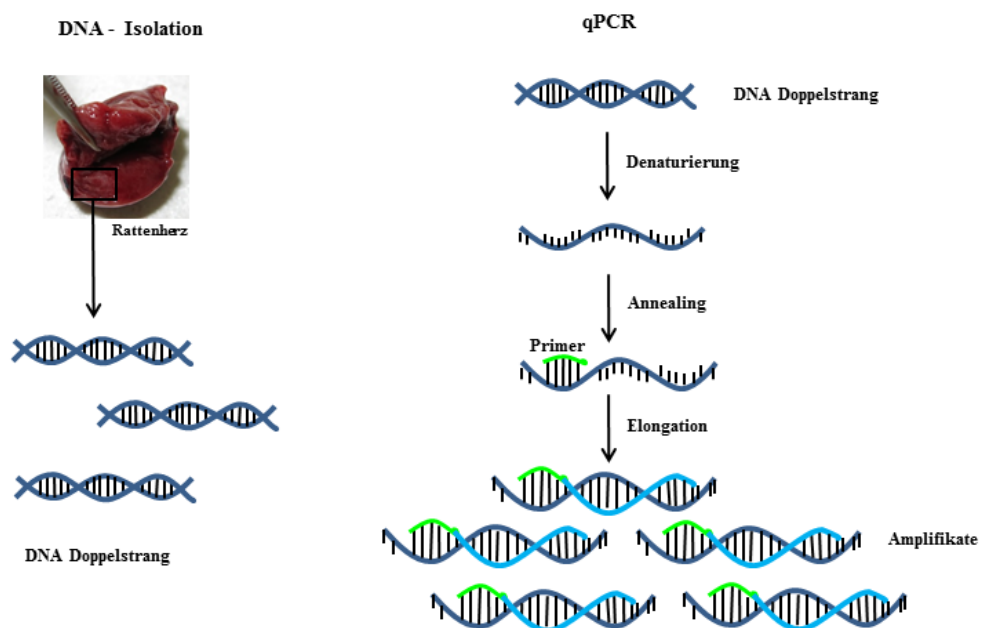
Mittels der entstandenen Schmelzkurven konnte gezeigt werden, ob es sich bei den entstandenen Amplifikaten um Produkte mit der gleichen Schmelztemperatur handelte.

Die Untersuchung der Proben wurde in Triplikaten durchgeführt und zusätzlich wurde pro Gen eine NTC (non-template control) Kontrolle ohne cDNA gemessen. Die Proben wurden ebenfalls auf das Referenzgen HPRT1 normalisiert, das eine stabile Expression aufweist.

Für die relative Quantifizierung der mRNA wurde die ddCq- Methode verwendet (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

### 3.6 Bestimmung der viralen Genkopien im Gewebe

*Prinzip: Die Bestimmung der viralen Genomkopien in den unterschiedlichen Geweben zur Überprüfung einer effektiven Transduktion erfolgte mit Hilfe der quantitativen PCR. Zuerst wurde die DNA aus den Geweben isoliert und diese dann durch spezifische Primer amplifiziert. Im Rahmen der Amplifikation wurden zur Ermittlung der Amplifikate zur DNA komplementäre Oligonukleotide verwendet, die auch als Hydrolysesonden bezeichnet werden. Zur Analyse wurde der Förster – Resonanzenergietransfer (FRET) genutzt. Die absolute Quantifizierung erfolgte über eine mitgemessene Standardkurve.*



**Abbildung III.9: Schema zum Ablauf der qPCR:** Zuerst wurde die DNA aus dem entsprechenden Organgewebe (als Beispielorgan ist hier ein Rattenherz dargestellt) isoliert. Mit Hilfe spezifischer Primer konnten im Rahmen der Polymerasen Kettenreaktion die gewünschten DNA-Sequenzen vervielfältigt werden.

#### 3.6.1 Gewebeaufreinigung und DNA-Isolation

Die Gewebeaufreinigung und die DNA Isolation erfolgten mit Hilfe des Qiagen DNeasy Blood and Tissue Kit. Das Protokoll wurde wie unten beschrieben abgeändert.

Die bei -80 °C gelagerten Gewebestücke wurden entsprechend den Angaben in Tab.III.7 mit einer Feinwaage abgewogen und mit einer Skalpellklinge zerkleinert, bevor sie in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt wurden.

**Tabelle III.7: Gewichtsangaben für Gewebeaufreinigung**

Gewebe	Gewicht
<b>Herz</b>	10 mg
<b>Leber</b>	10 mg
<b>Niere</b>	15 mg
<b>Milz</b>	15 mg
<b>Gehirn</b>	20 mg

Zu den vorbereiteten Proben wurden je 180 µl ATL Puffer und 20 µl Proteinase K dazugegeben und sofort mit dem Vortexer gemischt bevor die Proben bei 56 °C und 600 rpm inkubiert wurden, bis sich das Gewebe aufgelöst hat. Alle Gewebeproben bis auf die der Milz wurden für 3 Stunden inkubiert. Bei den Milzproben wurde der Zeitraum auf 12 Stunden ausgedehnt. Die Proben wurden während der Inkubationszeit mit dem Vortexer gemischt.

Nach vollständiger Auflösung der Proben wurden diese für 10 Minuten auf 22 °C Raumtemperatur gekühlt. Den Proben wurde 4 µl RNase A (100 mg/ml) zugegeben, danach wurden sie gemischt und für 4 Minuten bei 22 °C inkubiert. DEPC Wasser wurde auf 65 °C vorgewärmt und 75 µl zu jeder Probe hinzugegeben. Die Proben wurden für 15 s mit dem Vortexer gemischt, dann erfolgte die Zugabe von 200 µl AL Puffer bevor die Proben erneut gemischt wurden. Dann wurden 200 µl Ethanol (96 – 100 %) zugegeben und gemischt. Anschließend wurden die Proben auf eine DNasey Mini Spin Säule pipettiert und bei 6000 g für 1 Minute zentrifugiert. Die Säule wurde dann in ein neues 2 ml Auffanggefäß platziert, 500 µl AW1 Puffer wurden dazugegeben und erneut bei 6000 g für 1 Minute zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 500 µl AW2 Puffer wiederholt, wobei die Zentrifugation bei 20000 g für 3 Minuten stattfand. Die Säule wurde dann in das vorher vorbereitete Reaktionsgefäß gestellt, auf die Säulenmembran wurden 75 µl, auf 65 °C erwärmtes, DEPC Wasser pipettiert und für 1 Minute inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 6000 g für 2 Minuten. Das Eluat wurde wieder auf die Säule gegeben und bei den gleichen Bedingungen zentrifugiert.

Die Menge des Eluats wurde durch Wiegen bestimmt. Die DNA Konzentration wurde je 3 Mal pro Probe mit dem NanoDrop bei 2 µl Messvolumen aus dem Eluat gemessen und die Endkonzentration wurde daraus gemittelt.

### **3.6.2 Vorbereitung des Plasmidstandards**

#### **3.6.2.1 Standard-Stock-Lösung**

Zuerst wurden die Konzentrationen des Plasmids (pds-CMV/MLC260-S100A1) in einem Volumen von 2 µl mit dem NanoDrop gemessen. Diese Messungen wurden 5 Mal durchgeführt und die DNA Konzentrationen gemittelt. Die Plasmide wurden dann mit DEPC-Wasser auf eine Konzentration von 25 ng/µl verdünnt. Die endgültigen DNA-Konzentrationen wurden mit dem NanoDrop gemessen und bestimmt. Es wurden 10 µl Aliquots pipettiert und bei -20 °C gelagert.

#### **3.6.2.2 Standard-Arbeits-Lösungen**

Eines der Aliquots der Standard-Stock-Lösung wurde aufgetaut, kurz zentrifugiert und dann wurde DEPC-Wasser bis zu einem Gesamtvolumen von 100 µl hinzugefügt. Diese Probe war der erste Schritt in der Standard-Konzentrationsreihe und wurde Standard 1 genannt. Die Verdünnung dieser Standard-Lösung wurde im Verhältnis 1:10 fortgesetzt, um so die Standards-Nr. 2 - 9 zu erhalten. Die Verdünnungen wurden jeweils mit DEPC-Wasser angesetzt.

### **3.6.3 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)**

Um die Amplifizierung der gewünschten DNA-Fragmente durchführen zu können, wurde ein Master Mix (Tab.III.8) angesetzt. Die dafür verwendeten Primer und die verwendete Sonde sind in Tab.III.9 zusammengefasst.

In eine 96-well Platte wurden dann jeweils 22 µl des Mastermixes in die entsprechenden Wells pipettiert. Dazu wurden entweder 3 µl Standard-Lösung oder 3 µl isolierte DNA pipettiert.

Die Platte wurde mit einer Folie versiegelt zentrifugiert, bevor diese in den PCR-Cycler gestellt wurde.

**Tabelle III.8: PCR Reaktionsansatz (Master Mix)**

Bestandteil	Volumen
<b>iQ Multiplex Powermix</b>	12,5 µl
<b>10 pmol/µl CMVMLC260-Ig For</b>	0,5 µl
<b>10 pmol/µl S100A1 vt2.0 Rev</b>	0,5 µl
<b>10 pmol/µl S100A1 vt2.0 Sonde</b>	0,5 µl
<b>DEPC-Wasser (auf 22 µl auffüllen)</b>	8 µl
<b>PCR - Reaktionsansatz</b>	22 µl

**Tabelle III.9: Verwendete Primer und Sonde:**

Primer	Ziel Plasmid/Virus	Sequenz	Firma
<b>CMVMLC260-Ig For</b>	pds- CMV/MLC260 Plasmide /Virus	TGTCCACTCCC AGTTCAATTAC	MWG
<b>S100A1 vt2.0 Rev</b>	pds- CMV/MLC260 – S100A1	AACACGTTGAT GAGGGTCTC	MWG
<b>S100A1 vt2.0 Sonde</b>	hS100A1	ATCCGCGATGG GCTCTGAGCT	Biomers

Die Programmierung des PCR-Cyclers gewährte unterschiedliche Temperatur-Schritte:

- 1) 3 min bei 95 °C: Aktivierung der Taq-Polymerase
- 2) 15 sec bei 95 °C: Initiale thermische Denaturierung der DNA; hierbei werden die DNA Stränge voneinander getrennt
- 3) 1 min bei 60 °C: Annealing und Elongation in einem Schritt; hierbei können die Primer an die DNA anlagern und die Polymerase synthetisiert einen komplementären DNA-Strang

Nach einmaliger initialer Denaturierung wurden insgesamt 40 Amplifikationszyklen der Schritte 2) und 3) durchgeführt. Dabei wurde durch den Förster Resonanzenergietransfer (FRET) die Energie von einem angeregten Farbstoff, Reporter genannt, auf einen anderen Farbstoff, Quencher genannt, übertragen.

Dafür wurde in den Mastermix zusätzlich zu den spezifischen Primern ein für die Ziel-DNA spezifisches Oligonukleotid gegeben (siehe Tab.III.9). Diese Sonde hatte an dem 5'-Ende mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) und an dem 3'-Ende mit einem Quencher. Durch die räumliche Nähe zu einander wurde die Reporter-Fluoreszenz durch den FRET auf den Quencher übertragen und dadurch unterdrückt. Nach der Hybridisierung an die Ziel-DNA blieb die Fluoreszenz weiter unterdrückt. Aufgrund der 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase wurde die Sonde, beginnend an dem 5'-Ende, abgespalten, so dass sich Fluorophor und Quencher voneinander entfernten und dadurch eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden konnte (DIDENKO, 2001).

Diese Fluoreszenz stieg mit jedem PCR – Zyklus entsprechend der Zunahme an Amplifikaten an.

Als NTC Kontrollproben wurden 3 µl DEPC-Wasser verwendet. Alle Messungen wurden an Triplikaten durchgeführt.

Die absolute Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Standardkurve.

### **3.7 Statistische Auswertung**

In dieser Studie sollte die Durchführbarkeit des intravenösen Applikationsansatzes im Bezug auf einen erfolgreichen Gentransfer untersucht werden. Die Gruppengröße mit  $n = 3$  wurde bewusst niedrig gehalten, da es sich hierbei um eine Orientierungsstudie handelt. Interessante medizinische Ansätze können dann in Studien mit größerer Tierzahl bestätigt oder widerlegt werden.

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert und Standardfehler des Mittelwertes angegeben. Die Daten wurden mit dem nicht parametrischen Kruskal-Wallis-Test und dem Dunn's Multiple Comparison Post-Test ausgewertet. Der lineare Zusammenhang zweier Merkmale wurde mit der Korrelation nach Pearson untersucht. Ein Signifikanzniveau von  $p \leq 0,05$  wurde als statistisch signifikantes Ergebnis gewertet. Die statistischen Berechnungen und Analysen wurden mit der Software Graph Pad Prism (Version 6) durchgeführt.



### 3.8 Eingesetztes Material

Verwendete Materialien	Firma
<b>BD NEOFLON Venenverweilkatheter 24 G 0,7x19 mm</b>	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
<b>Einbettformen</b>	Leica, Nussloch
<b>Einbettkassetten (Histosette)</b>	Neolab Migge GmbH, Heidelberg
<b>Gammex PF IsoDerm sterile Handschuhe 6,5</b>	Ansell Healthcare Germany, München
<b>Gazin Mullkompresse 10x10 cm</b>	Lohmann & Rauscher GmbH & Co. KG, Rengsdorf
<b>Griffstopfen</b>	Greiner Bio – One GmbH, Frickenhausen
<b>Injekt-F Tuberkulin 0,01-1ml Luer solo, steril</b>	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
<b>Pipetten in verschiedenen Größen</b>	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Pipettenspitzen in verschiedenen Größen</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Injekt Einmalspritze 2 (3) ml</b>	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
<b>Flexible Plastik-Wägeschalen Größe I-III</b>	Neolab Migge GmbH, Heidelberg
<b>Polystyrol Röhrchen, runder Boden</b>	Greiner Bio – One GmbH, Frickenhausen
<b>Prolene 3-0 SH 75 cm</b>	Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt
<b>S - Monovette 1,2 ml Lithium- Heparin</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>S - Monovette 1,4 ml Citrat</b>	Sarstedt, Nümbrecht
<b>Safil 2-0 12x45 cm</b>	Aesculap AG, Tuttlingen
<b>Safil 4-0 3x45 cm</b>	Aesculap AG, Tuttlingen
<b>Skalpellklinge</b>	PFM medical AG, Köln

<b>Gerät</b>	<b>Firma</b>
<b>Druckvolumen Kathetersystem</b>	Transonic Europe B.V., MB Elsloo, Niederlande
<b>Einbettmaschine</b>	Leica Biosystems, Nussloch
<b>Feinwaage</b>	Kern & Sohn, Balingen-Frommern
<b>Kugelmühle</b>	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
<b>Mikroskop Labomed CxL</b>	Labo America, Inc. Fremont, CA, USA
<b>Mikrotom</b>	Leica Biosystems, Nussloch
<b>NanoDrop</b>	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
<b>Narkosegerät</b>	Provet AG, Lyssach, Schweiz
<b>Odysee CLX</b>	Licor Bioscience GmbH, Bad Homburg
<b>PCR CFX 96 Real-Time System</b>	Biorad Laboratories GmbH, München
<b>Photometer</b>	SI Scientific Instruments GmbH, Gilching
<b>PowerPac basic</b>	Biorad Laboratories GmbH, München
<b>Themocycler</b>	Biorad Laboratories GmbH, München
<b>Thermomixer</b>	Eppendorf AG, Hamburg
<b>Tisch - Zentrifuge</b>	Neolab Migge GmbH, Heidelberg
<b>Vortex Mixer</b>	Neolab Migge GmbH, Heidelberg
<b>Waage</b>	Sartorius AG, Göttingen
<b>Wasserbad</b>	Smiths Medical Deutschland GmbH, Grasbrunn
<b>Zentrifuge</b>	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
<b>Mikrowelle</b>	Sharp Electronics (Europe) GmbH, Hamburg
<b>Tankblotkammer</b>	Universitätsklinikum Heidelberg

Verwendete Software	Hersteller
<b>Motic Connect T</b>	Motic Deutschland GmbH, Wetzlar
<b>Image J</b>	Wayne Rasband (National Institutes of Health), USA
<b>GraphPad Prism 6</b>	GraphPad Software, Inc., La Jolla CA, USA
<b>LabScribe3</b>	iWorx Systems Inc., Dover, NH, USA
<b>Licor Image Studio</b>	Licor Bioscience GmbH, Bad Homburg
<b>CFX Manager</b>	Biorad Laboratories GmbH, München

Verwendete Kits	Firma
<b>DC Protein Assay</b>	Biorad Laboratories GmbH, München
<b>DNeasy Blood and Tissue Kit</b>	Qiagen GmbH Germany, Hilden
<b>RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit</b>	Qiagen GmbH Germany, Hilden
<b>Vectastain Universal Elite ABC Kit</b>	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

Medikamente	Firma
<b>BEPANTHEN® Augen- und Nasensalbe</b>	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach - Wyhlen
<b>Carprieve</b>	Norbrook Laboratories Ltd, Northamptonshire, GB
<b>Isofluran</b>	Henry Schein VET GmbH, Hamburg
<b>Isotone Kochsalz-Lösung 0,9%</b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<b>Ketamin 10 % Injektionslösung</b>	Bremer Pharma GmbH, Warburg
<b>PVP-Iod-Lösung (Braunol)</b>	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
<b>Xylarium 20mg Xylazin Injektionslösung</b>	Ecuphar N.V., Oostkamp, Belgien

Verwendete Reagenzien	Firma
<b>CaCl<sub>2</sub></b>	AppliChem GmbH, Darmstadt
<b>Citratpuffer (pH 6)</b>	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, München
<b>cOmplete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Tabletten</b>	Roche Deutschland Holding GmbH, Grenzach - Wyhlen
<b>Dako Liquid DAB+ Substrate</b>	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
<b>EDTA</b>	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, München
<b>EGTA</b>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<b>Ethanol</b>	Zentrallager Universitätsklinikum Heidelberg
<b>Methanol</b>	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, München
<b>NaCl</b>	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, München
<b>PBS</b>	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, München
<b>SDS</b>	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
<b>Taurin</b>	Sigma – Aldrich Chemie GmbH, München
<b>TRIS</b>	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
<b>Tropix I – Block</b>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
<b>Xylol</b>	Zentrallager Universitätsklinikum Heidelberg

Antikörper	Klon	Isotyp	Verwendung	Verdünnung	Firma
<b>Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase GAPDH</b>	Mono - clonal IgG	Maus	WB	1:10000	Merck KGaA, Darmstadt
<b>IgG control</b>	Mono - clonal	Maus	IHC	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg
<b>S100A1</b>	Poly - clonal	Ratte	WB	1:1000	Acris Antibodies GmbH, Herford
<b>S100A1</b>	Mono - clonal	Maus	IHC	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg

Zweit - Antikörper	Isotyp	Fluorophor	Verwendung	Verdünnung	Firma
<b>Anti - rabbit</b>	Goat	IRDye 680 (MW950)	WB	1:10000	Licor Bioscience GmbH, Bad Homburg
<b>Anti - mouse</b>	Goat	IRDye 800 CW (MW1166)	WB	1:10000	Licor Bioscience GmbH, Bad Homburg
<b>Biotinylierter anti-mouse/rabbit IgG</b>	Horse	----	IHC	1:50	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA, USA

## **IV. ERGEBNISSE**

### **1. Ergebnisse zum Erfolg des Gentransfers**

*Im Rahmen der Gentherapie werden sogenannte AAVs (Adeno - assoziierte Viren) als Gen - Führe eingesetzt. Mit ihrer Hilfe sollen therapeutische DNA-Sequenzen in die Zellkerne der Zielzellen eingeschleust werden. Diesen Vorgang nennt man Transduktion. In den Zellkernen wird die DNA-Sequenz freigesetzt und kann in eine Messenger-RNA (mRNA) transkribiert werden. Bei der nachfolgenden Translation wird die, in der mRNA codierte, Aminosäuresequenz des gewünschten Proteins (in diesem Fall S100A1) erzeugt und das Protein kann in der Zelle exprimiert werden. In der vorliegenden Arbeit sollte gezeigt werden, dass es bei einer systemischen AAV Gabe zu einer Transduktion der DNA und daraus resultierend zu einer vermehrten Expression von S100A1 in den gewünschten Zellen, den Kardiomyozyten, kommt.*

## 1.1 Transduktion

Der erste Schritt für einen erfolgreichen Gentransfer ist eine erfolgreiche Transduktion der gewünschten Zielzellen, in unserem Fall der Kardiomyozyten. Zur Untersuchung des Transduktionsvorganges werden die viralen Genomkopien mittels qPCR in den Gewebeproben ermittelt. Aufgrund der systemischen Virus-Gabe in unserer Studie wurde diese quantitative Analyse der Genomkopien auch mit Gewebeproben anderer lebenswichtiger Organe durchgeführt. Dabei wurde überprüft, ob es bei der gewünschten Translation in kardialen Gewebe oder in den Zellen anderer Organe einen Zusammenhang mit einer ansteigenden Virus-Dosis gibt.

In allen untersuchten Organen bis auf das Gehirn ergab sich ein Trend für einen Anstieg der viralen Genkopien bei ansteigender Virus-Dosis (s.Abb.VI.1A-E). Eine signifikante Erhöhung der Genomkopien nach intravenöser Applikation der höchsten Virus-Dosis im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich in den Gewebeproben des linken Ventrikels, der Leber, der Niere und der Milz (siehe Abb.VI.1A, C-E). Obwohl sich ein Bezug der viralen Genomkopien zur jeweiligen Virus-Dosis in diesen Organen tendenziell abzeichnete, konnte dies aufgrund der geringen Tierzahl statistisch nicht bestätigt werden. Im Gehirn konnten virale Genomkopien nachgewiesen werden. Aufgrund der Tatsache, dass nur ein Tier untersucht wurde, ließ sich ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe bei keiner Virus-Dosis nachweisen.

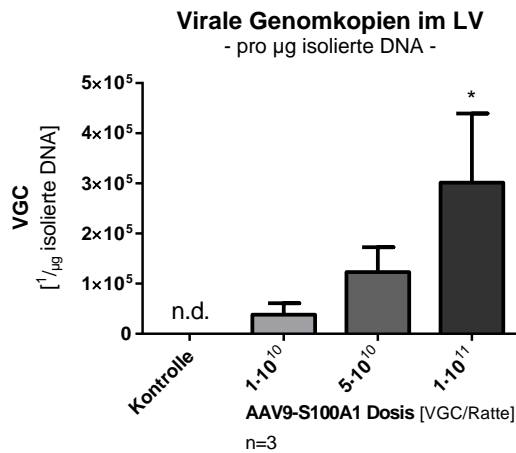


Abb.IV.1A

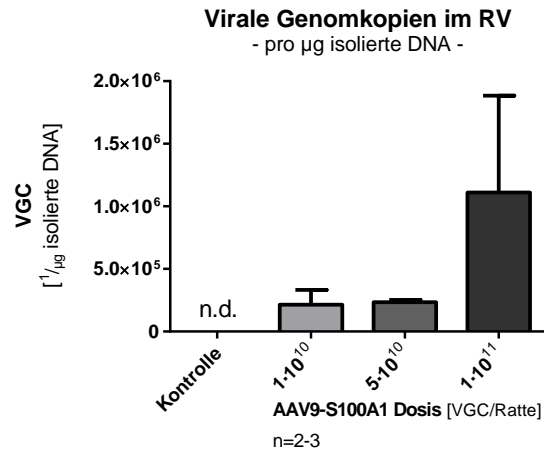


Abb.IV.1B

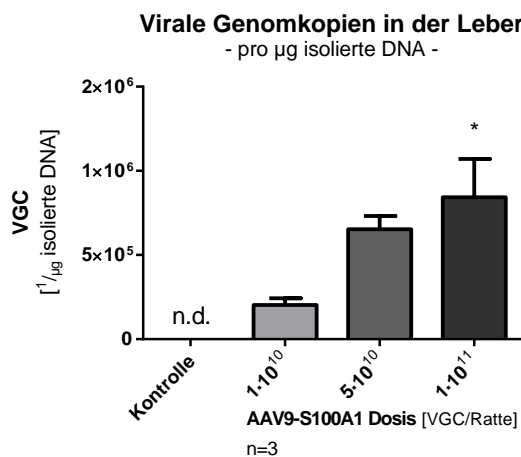


Abb.IV.1C

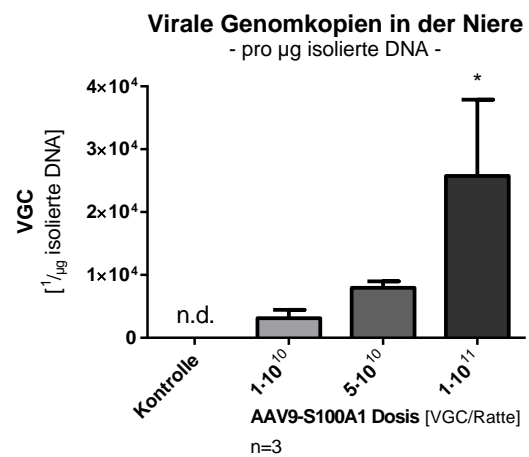


Abb.IV.1D

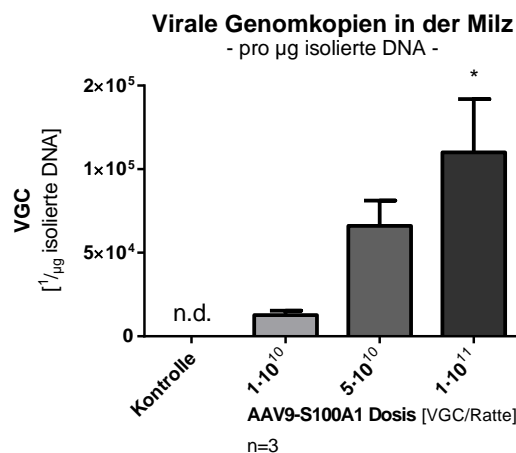


Abb.IV.1E

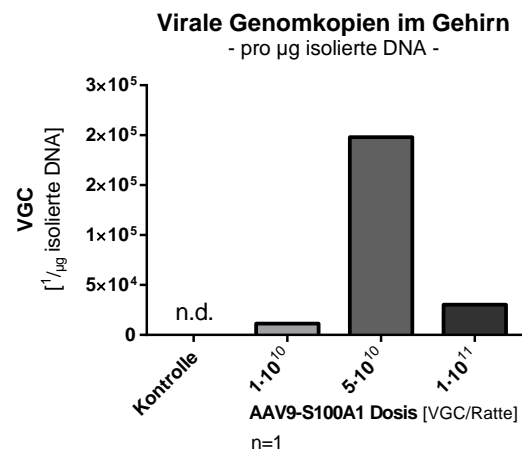


Abb.IV.1F

#### Abbildung IV.1A - F: Organspezifische Ergebnisse der Transduktion nach intravenöser Virus-Applikation bei Ratten

Eine tendenzielle Zunahme der viralen Genomkopien mit zunehmender Dosis zeigte sich im LV, im RV, in der Leber, der Niere und der Milz. Ein signifikanter Unterschied der höchsten Dosis zur Kontrollgruppe, mit Ausnahme des RV, konnte nachgewiesen werden. Virale Genomkopien waren auch im Gehirn der untersuchten Ratte zumindest nachweisbar (\*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle, Mittelwerte + SEM).



## 1.2 Transkription

Der nächste Schritt für einen erfolgreichen Gentransfer ist eine Umwandlung der eingeschleusten DNA-Sequenz in mRNA im Zielorgan. Um diese Transkription in den verschiedenen Geweben zu messen, wurde zunächst RNA isoliert und mit Hilfe der RT – PCR analysiert. Zur relativen Quantifizierung der Daten wurde die ddCq- Methode verwendet (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

Um die Auswirkungen des Gentransfers genau darzustellen, wurden folgende Parameter bestimmt:

- mRNA des endogenen Ratten rS100A1
- mRNA des eingeschleusten humanem hS100A1
- Gesamt mRNA S100A1 (r+h)

Die Daten der endogenen rS100A1 mRNA (s. Abb.IV.2A-F, Abb.IV.3 und 4A-C) und die der Gesamt-S100A1 mRNA (s. Abb.IV.7A-F, 8A-C und 9) wurden jeweils auf die Kontrollwerte normalisiert. D.h. die dargestellten Werte beziehen sich auf die jeweiligen Kontrollen. Es kann also eine Aussage über das Verhältnis der erhaltenen Daten zu den Kontrollwerten getroffen werden.

So ließ sich feststellen, dass der Gentransfer mit ansteigender Virus-Dosis keinen Effekt auf den Gehalt der vorhandenen endogenen S100A1 mRNA hat. Die endogenen rS100A1 mRNA Level in allen untersuchten Organen verändern sich trotz deutlicher Virus-Dosis-Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle nicht (siehe Abb.IV.2A - F).

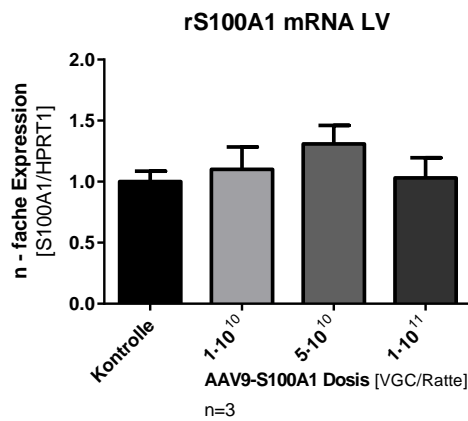


Abb.IV.2A

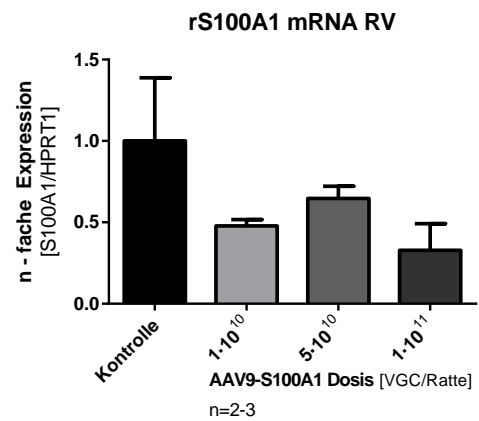


Abb.IV.2B

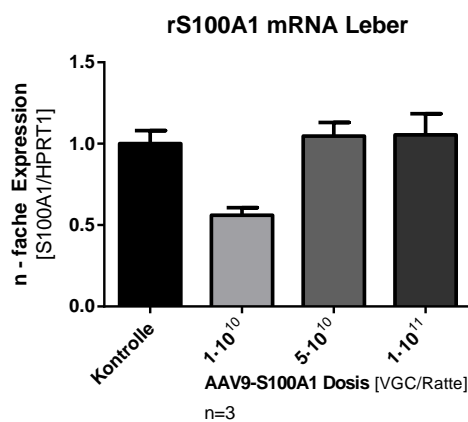


Abb.IV.2C

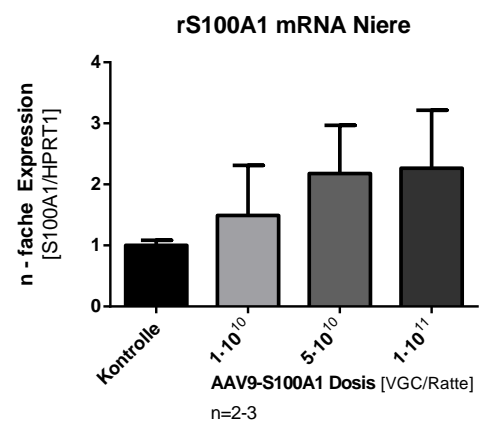


Abb.IV.2D

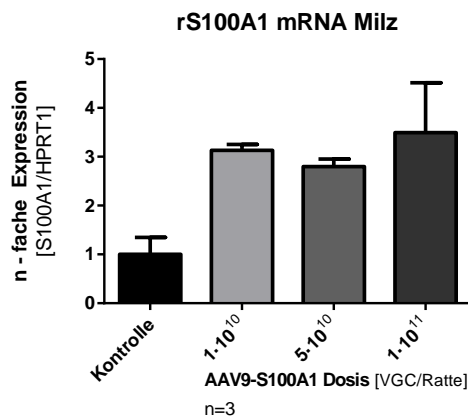


Abb.IV.2E

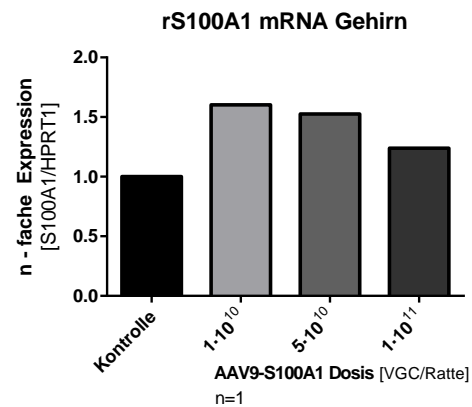


Abb.IV.2F

**Abbildung IV.2A - F: Organspezifische mRNA Expressionslevel des endogenen rS100A1 nach intravenöser Virusapplikation bei Ratten**

In den verschiedenen Organen konnten keine Auswirkungen der ansteigenden Virus-Dosis auf den endogenen mRNA Level des rS100A1 gezeigt werden (Mittelwerte + SEM).

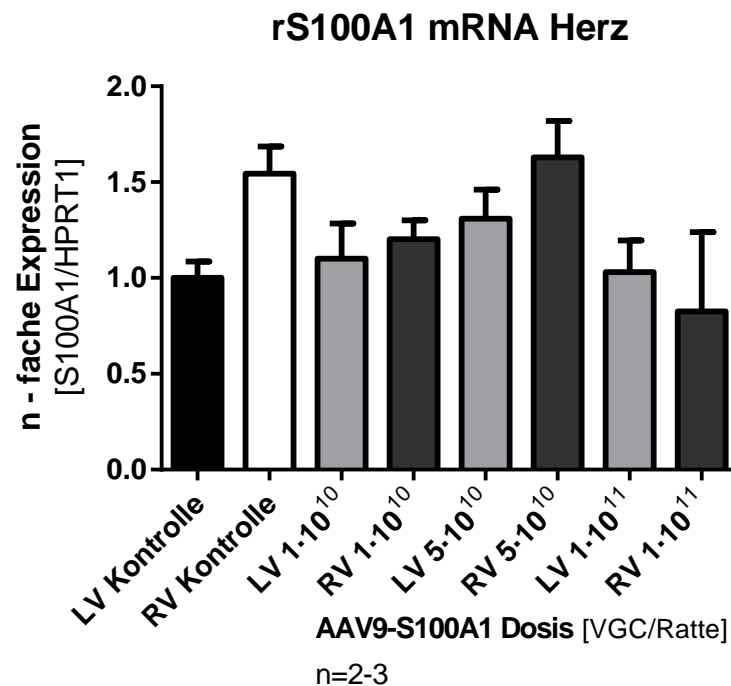


Abb. IV.3

**Abbildung IV.3: Vergleich der mRNA Expressionslevel für rS100A1 im linken und rechten Ventrikel des Herzens der Ratte nach intravenöser Virusapplikation**

In beiden Ventrikeln konnte kein Unterschied der endogenen rS100A1 mRNA bei ansteigender Virus-Dosis dargestellt werden (Mittelwerte + SEM, normalisiert auf LV Kontrolle).

Im direkten Vergleich der endogenen rS100A1 mRNA Level des linken und rechten Ventrikel zeigte sich keinen quantitativer Unterschied in der Expression. Auch bei ansteigender Virus-Dosis konnte kein Effekt auf die endogene mRNA im Herzen nachgewiesen werden (siehe Abb.IV.3).

In den Abb.IV.4A-C wurden die Werte der endogenen rS100A1 mRNA Level aller untersuchten Organe für eine der drei verschiedenen Virus-Dosisierungen und für die Kontrolltiere zusammengefasst. In jedem Organ wurde endogene S100A1 mRNA nachgewiesen werden. Tendenziell wurde dabei in der Leber immer eine besonders geringe Menge mRNA und in der Niere immer eine besonders große Menge mRNA gefunden. Dies war jedoch statistisch nicht belegbar.

Dieser direkte Vergleich aller Organe (siehe Abb.IV.4A-C) verdeutlicht nochmals den nicht vorhandenen Effekt des Gentransfers auf die endogene S100A1 mRNA.

rS100A1 mRNA Organvergleich

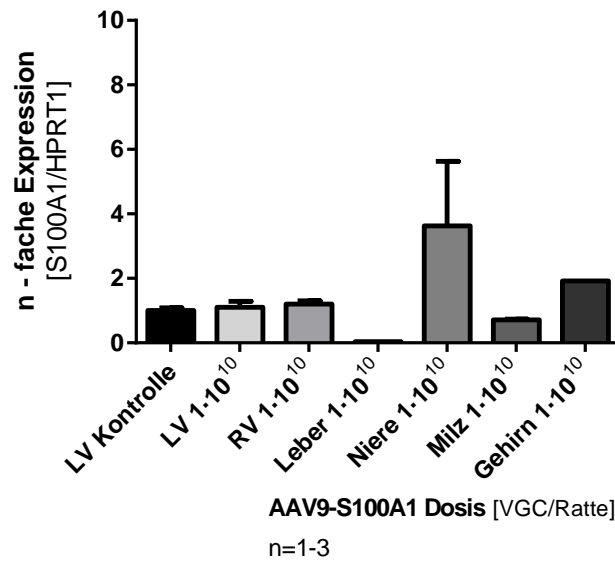


Abb. IV.4A

rS100A1 mRNA Organvergleich

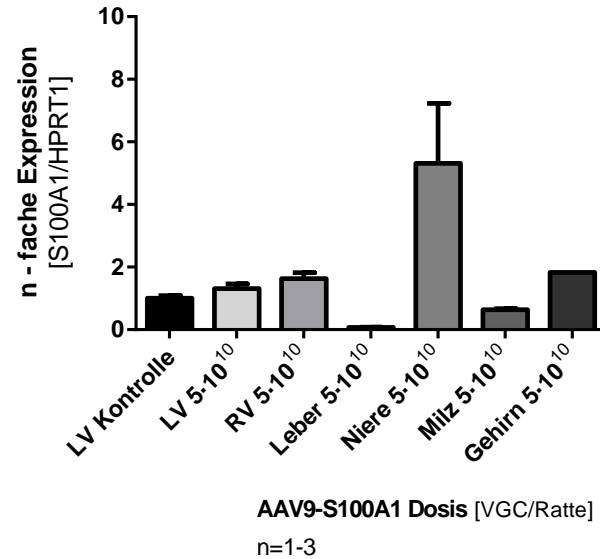


Abb.IV.4B

rS100A1 mRNA Organvergleich

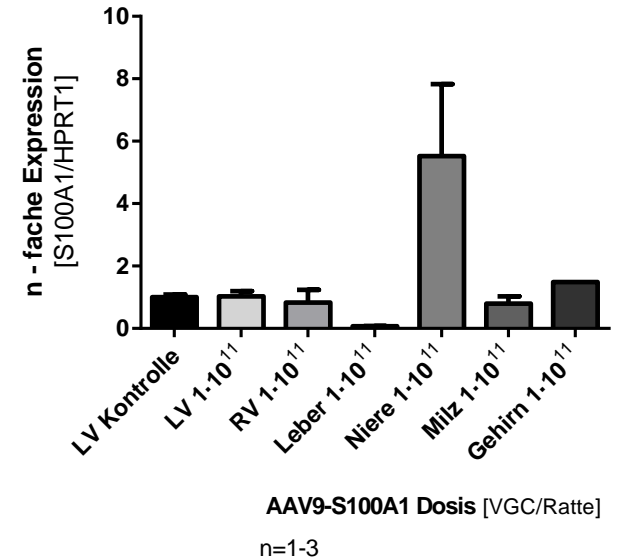


Abb.IV.4C

#### Abbildung IV.4A – C: Organspezifische mRNA-Expressionslevel des endogenen rS100A1 nach intravenöser Virus-Applikation bei der Ratte

Im Vergleich der endogenen S100A1 mRNA aller Organe zueinander konnte bei den unterschiedlichen Virus-Dosierungen kein Effekt nachgewiesen werden (Mittelwerte + SEM, normalisiert auf LV Kontrolle).

Wurden dagegen die organspezifischen Level der humanen hS100A1 mRNA erfasst, so zeigte sich tendenziell eine dosisabhängige Expressionssteigerung im LV, RV und der Leber (siehe Abb.IV.5A - C). Im linken und rechten Ventrikel konnte sogar ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der höchsten Virus-Dosis nachgewiesen werden. In der Niere wurde immer nur eine geringe Menge von humaner S100A1 mRNA nachgewiesen. Dementsprechend zeigten sich auch keine dosisabhängigen Effekte (Daten nicht gezeigt). In der Milz und im Gehirn konnte keine hS100A1 mRNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Aufgrund der nicht vorhandenen hS100A1 mRNA in den Kontrollproben konnte die n-fache Expression der hS100A1 mRNA in den Gewebeproben der untersuchten Organe der behandelten Tiere nicht angegeben werden. Deshalb wurde in den untersuchten Gewebeproben die relative Expression der hS100A1 mRNA auf die der HPRT1 mRNA normalisiert und als „RQ-Wert“ in den Abb.IV.5A-C und IV.6A-C angegeben.

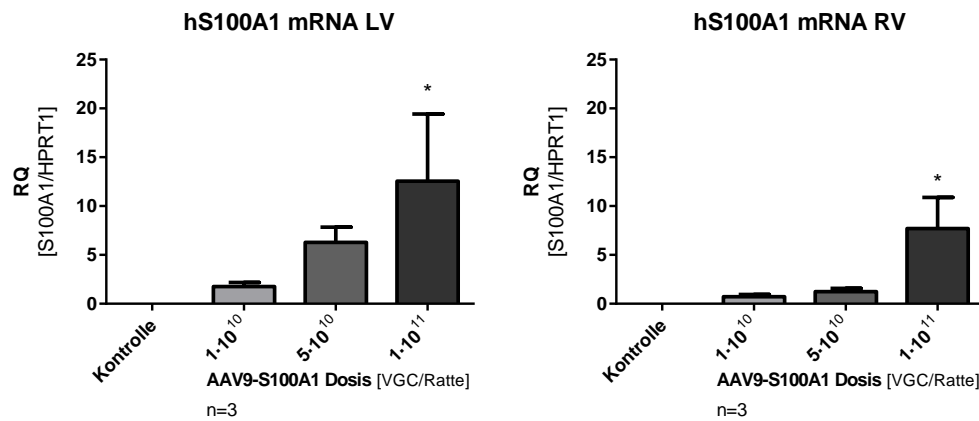


Abb.IV.5A

Abb.IV.5B

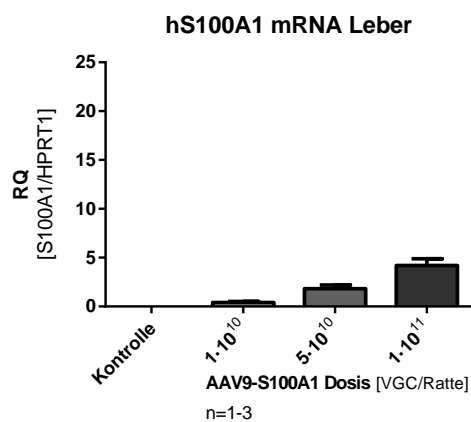


Abb.IV.5C

**Abbildung IV.5A - C: Organspezifische mRNA Expressionslevel des humanen hS100A1 nach intravenöser Virus-Applikation bei Ratten**

Es zeigt sich tendenziell eine dosisabhängige Zunahme der Expressionslevel im LV, RV des Herzens und in der Leber; im linken und rechten Ventrikel gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen dem mittleren Expressionslevel bei der Kontrollgruppe und der höchsten Virus-Dosis (\*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle, Mittelwerte + SEM).

Eine zusammenfassende Darstellung der humanen S100A1 mRNA Level aller untersuchten Organe für jeweils eine der drei verwendeten Virus-Dosierungen (Abb.IV.6A-C) zeigt messbare hS100A1 mRNA Level im LV, RV des Herzens und in der Leber. Zudem kann wiederum bei zunehmender Virus-Dosis ein tendenzieller Anstieg der mRNA Level in den genannten Organen verzeichnet werden. Dabei ist der Anstieg im linken Ventrikel immer am deutlichsten ausgeprägt. In den Organen Milz, Niere und Gehirn ist ein messbarer mRNA Level nicht nachweisbar.

hS100A1 mRNA Organvergleich

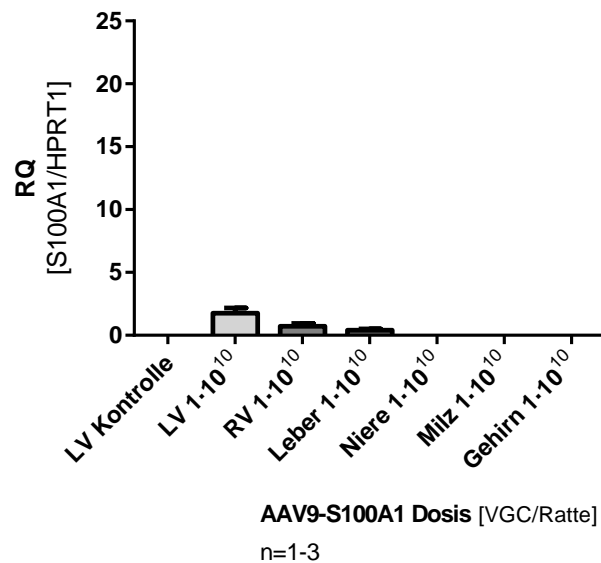


Abb.IV.6A

hS100A1 mRNA Organvergleich

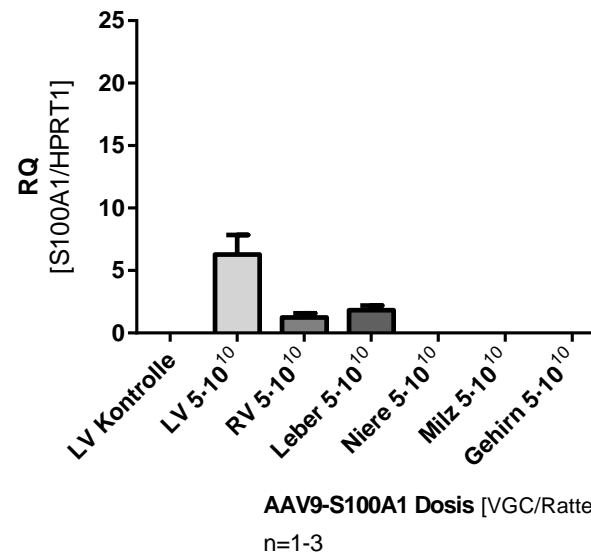


Abb.IV.6B

hS100A1 mRNA Organvergleich

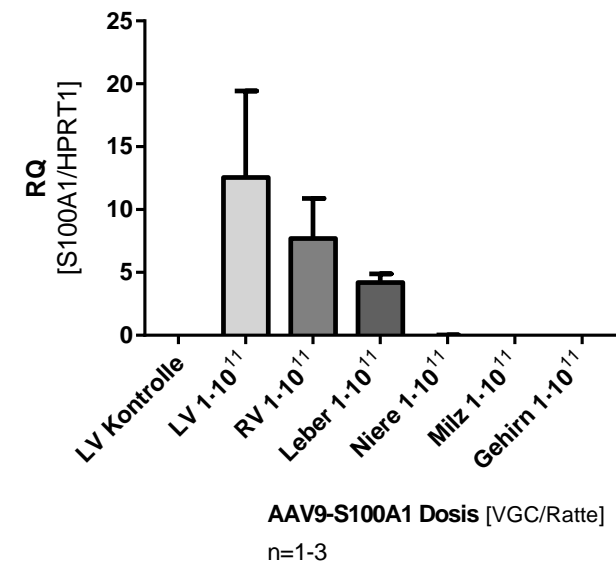


Abb.6C

#### Abbildung IV.6A-C: Organspezifische mRNA-Expressionslevel des humane hS100A1 nach intravenöser Virus-Applikation bei der Ratte

Im Vergleich der humanen S100A1 mRNA aller Organe zueinander kann im linken Ventrikel, rechten Ventrikel und in der Leber tendenziell ein Anstieg bei zunehmender Virus-Dosis verzeichnet werden (Mittelwerte + SEM).

Zur Vervollständigung dieses Untersuchungsabschnittes wurde die organspezifische S100A1 Gesamt mRNA (für rS100A1 + hS100A1) in den Gewebeproben bestimmt. Die dadurch erhaltenen Ergebnisse liefern Hinweise auf die gesamten S100A1 mRNA Level nach dem Gentransfer in den untersuchten Gewebeproben.

Bei Darstellung dieser S100A1 Gesamt – mRNA (für rS100A + hS100A1) zeigte sich in folgenden Organen tendenziell eine dosisabhängige Steigerung der mRNA Expression: im linken Ventrikel, im rechten Ventrikel und in der Leber, wie in Abb.IV.7A-C dargestellt. Im rechten Ventrikel war bei der höchsten Virus-Dosis eine Abnahme tendenziell erkennbar. In der Leber konnte ein signifikanter Unterschied der Expressionswerte zwischen der Kontrollgruppe und der höchsten Virus-Dosis nachgewiesen werden (siehe Abb.IV.7C). Im Gegensatz dazu konnten in der Niere, der Milz und im Gehirn keine Unterschiede in den Expressionslevel der S100A1-Gesamt-mRNA in Abhängigkeit zur Virus-Dosis gezeigt werden (siehe Abb.IV.7D-F).

Im Vergleich der Gesamt-S100A1 mRNA aller untersuchten Organe zueinander für jede Virus-Dosis (Abb.IV.8A-C) wurde tendenziell eine Zunahme der Expressionslevel im linken Ventrikel und der Leber bestätigt. In der Leber war der Anstieg optisch sehr ausgeprägt. Der Effekt im rechten Ventrikel (Abb.IV.7B) konnte nicht dargestellt werden.



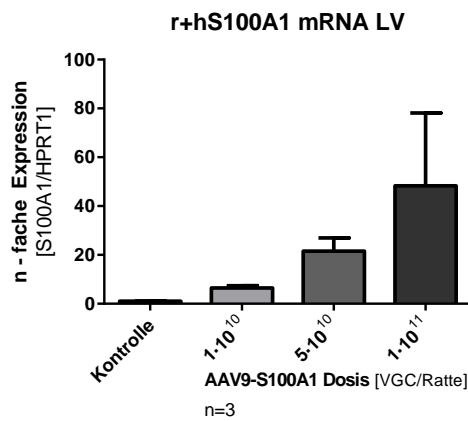


Abb.IV.7A

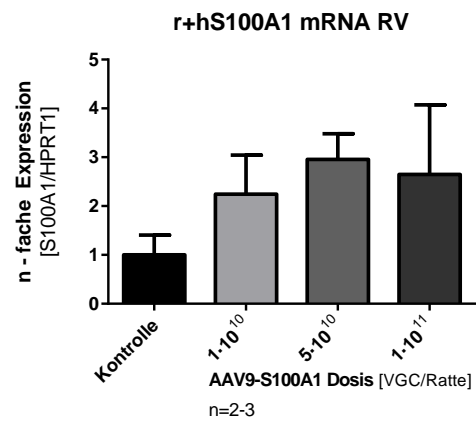


Abb.IV.7B

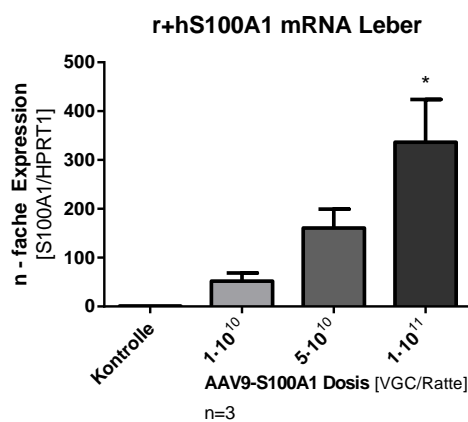


Abb.IV.7C

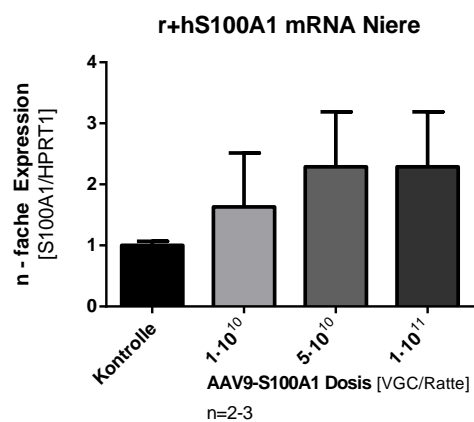


Abb.IV.7D

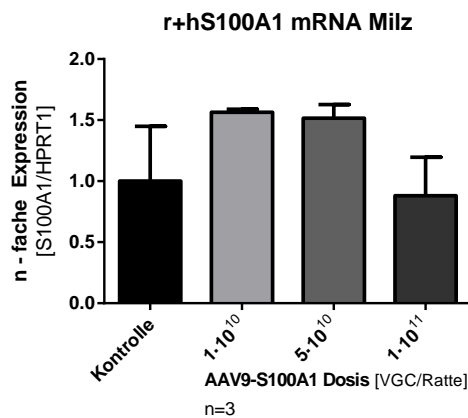


Abb.IV.7E

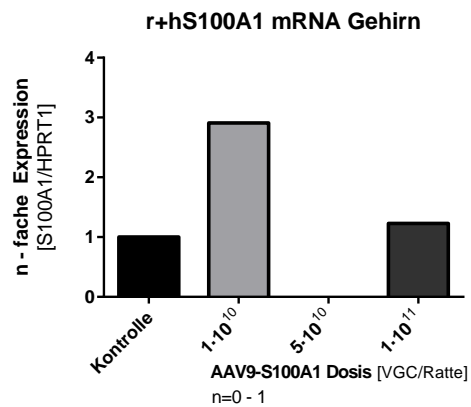
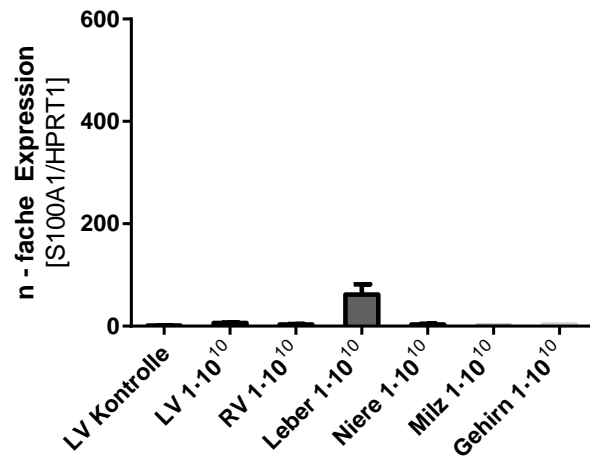


Abb.IV.7F

#### Abbildung IV.7A - F: Organspezifische mRNA Expressionslevel des Gesamt-S100A1 nach intravenöser Virus-Applikation bei Ratten

Eine tendenzielle Steigerung der mRNA Level des Gesamt S100A1 in Abhängigkeit der Virus-Dosis konnte im LV, RV des Herzens und in der Leber gezeigt werden. In der Leber gibt es einen signifikanten Unterschied zwischen dem mittleren Expressionslevel der Kontrollgruppe und bei der höchsten Virus-Dosis (\*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle, Mittelwerte + SEM, normalisiert auf LV Kontrolle).

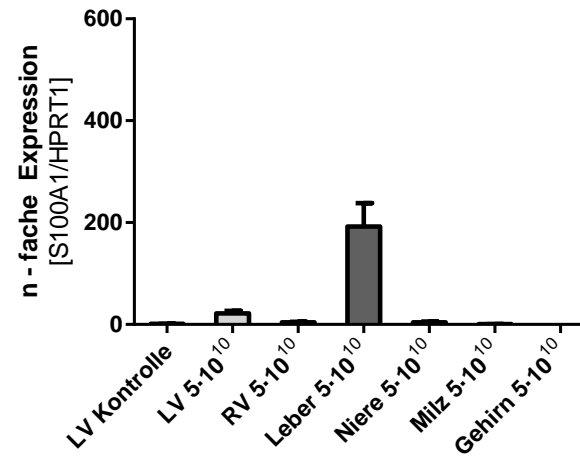
r+hS100A1 mRNA Organvergleich



AAV9-S100A1 Dosis [VGC/Ratte]  
n=1-3

Abb.IV.8A

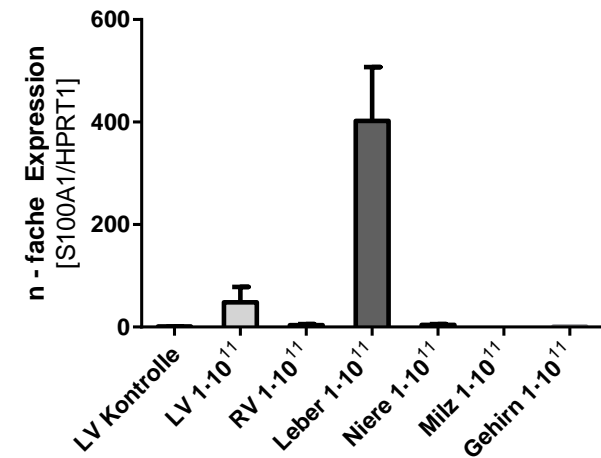
r+hS100A1 mRNA Organvergleich



AAV9-S100A1 Dosis [VGC/Ratte]  
n=1-3

Abb.IV.8B

r+hS100A1 mRNA Organvergleich



AAV9-S100A1 Dosis [VGC/Ratte]  
n=1-3

Abb.IV.8C

#### Abbildung IV.8A-C: Organspezifische mRNA-Expressionslevel der Gesamt-S100A1 nach intravenöser Virus-Applikation bei der Ratte

Im Vergleich der Gesamt-S100A1 mRNA aller Organe konnte tendenziell ein Anstieg im linken Ventrikel und in der Leber nachgewiesen werden (Mittelwerte + SEM, normalisiert auf LV Kontrolle).

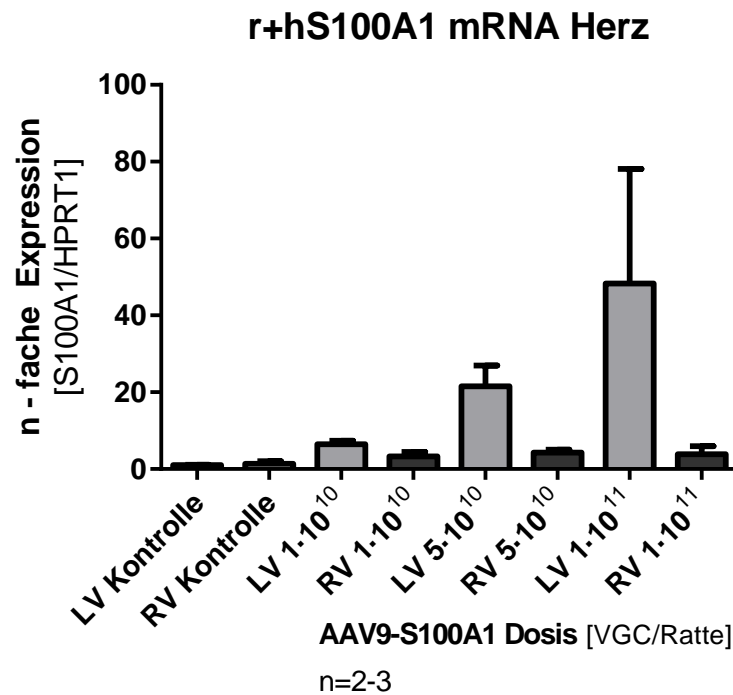


Abb.IV.9

**Abbildung IV.9: Vergleich der mRNA Expressionslevel für die Gesamt-mRNA im linken und rechten Ventrikel des Herzens der Ratte nach intravenöser Virus-Applikation**

Im linken Ventrikel wurde eine tendenzielle Zunahme der Gesamt-S100A1 mRNA aufgezeigt, diese konnte allerdings statistisch nicht bestätigt werden. Im rechten Ventrikel zeigte sich keine Änderung der Gesamt-S100A1 mRNA Expressionslevel (Mittelwerte + SEM, normalisiert auf LV Kontrolle).

Im direkten Vergleich der Gesamt-S100A1 mRNA Level des linken und rechten Ventrikels (Abb.IV.9) zeigte sich eine tendenzielle, aber optisch ausgeprägte Zunahme der Expressionslevel im linken Ventrikel bei ansteigender Virus-Dosis. Die Expressionslevel im RV zeigten keine Veränderung.

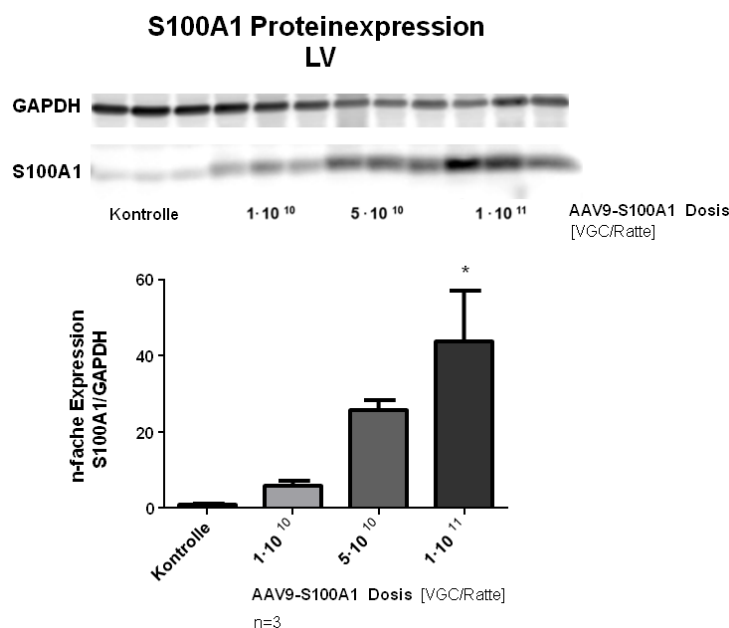
### 1.3 Translation

Der Gentransfer soll das Expressionslevel des S100A1 Proteins insbesondere in den Zielzellen, den Kardiomyozyten, beeinflussen und dort eine Überexpression bewirken. Dieser Effekt wird durch eine erfolgreiche Translation bestätigt, die mit Hilfe der Western Blot Technik nachgewiesen werden kann. Der verwendete Antikörper erkennt neben dem humanen S100A1 auch das endogene Ratten S100A1.

Da davon auszugehen war, dass diese Translation außer im Myokard des Herzens auch in weiteren lebenswichtigen Organen stattfindet, wurde die S100A1 Proteinexpression auch dort bestimmt. Als Referenzprotein wurde GAPDH verwendet und die Werte der Gewebeproben wurden auf die jeweiligen Kontrollwerte normalisiert, um die Überexpression des S100A1 darzustellen.

Im linken und rechten Ventrikel, sowie in der Leber konnte eine tendenzielle Zunahme der S100A1 Proteinexpression in Abhängigkeit der Virus-Dosis gezeigt werden. Nur bei der höchsten Virus-Dosis gabe es in diesen Organen einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (Abb.IV.10A – C).

Wie in den Abbildungen IV.10D – F gezeigt, konnte in den anderen Organen (Niere, Milz und Gehirn) ebenfalls eine S100A1 Expression nachgewiesen werden, allerdings in sehr geringem Ausmaß und ohne Bezug zu den ansteigenden Virus-Dosierungen.



**Abbildung IV.10A:  
Dosisabhängige S100A1  
Proteinexpression im  
LV der Rattenherzen  
nach intravenöser  
Virus-Applikation**

oben: Darstellung des S100A1 im Western Blots;  
unten: Darstellung der dosisabhängigen S100A1 Proteinexpression mit einem signifikanten Unterschied der höchsten Virus-Dosis zur Kontrollgruppe (\*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle, Mittelwerte + SEM).

Abb.IV.10A

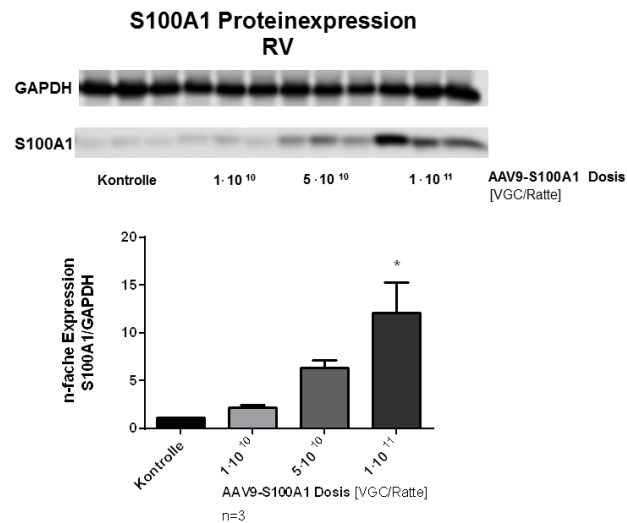


Abb.IV.10B

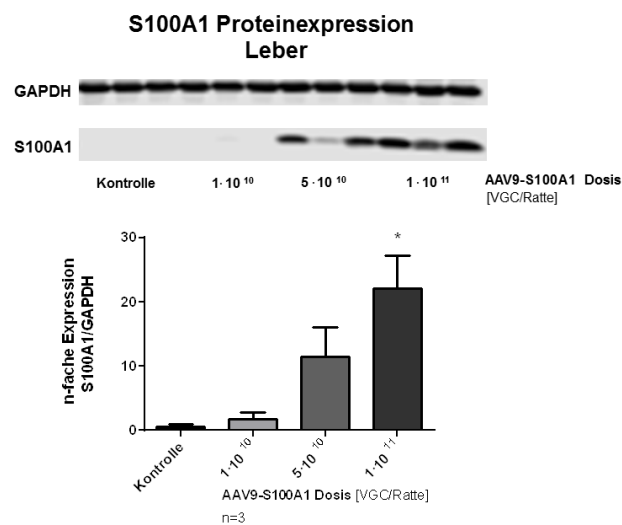


Abb.IV.10C

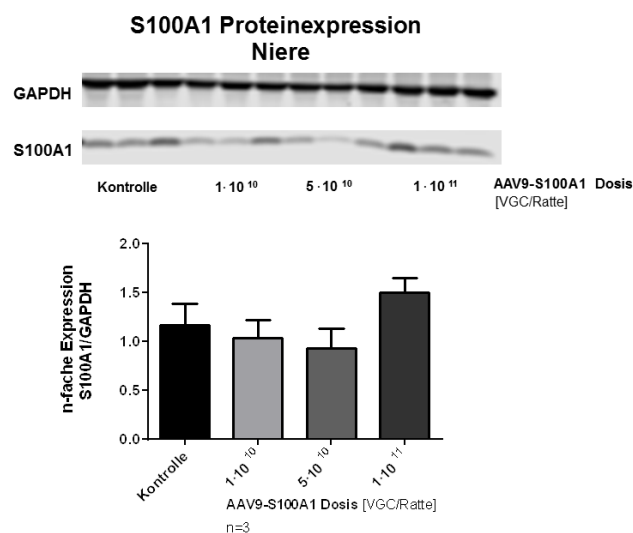


Abb.IV.10D

**Abbildung IV.10B-D: Dosisabhängige S100A1 Proteinexpression im RV des Rattenherzens, in der Leber und der Niere nach intravenöser Virus-Applikation**

oben: Darstellung des S100A1 im Western Blot ;

unten: Darstellung der dosisabhängigen S100A1 Proteinexpression bei RV, Leber und Niere mit einem signifikanten Unterschied der höchsten Virus-Dosis zur Kontrollgruppe im RV und in der Leber (\*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle, Mittelwerte + SEM).

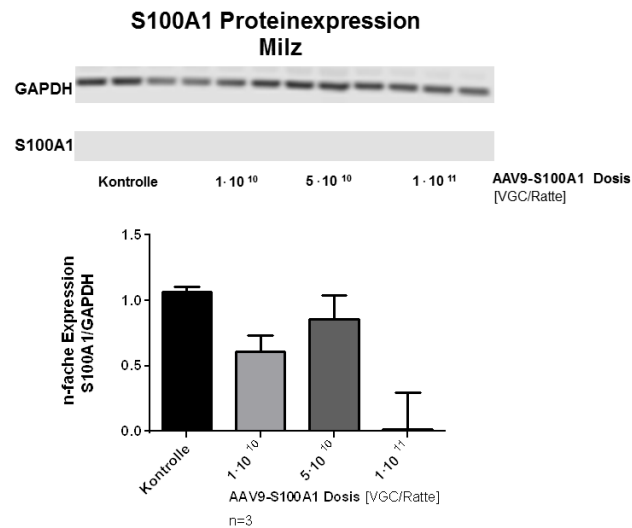


Abb.IV.10E

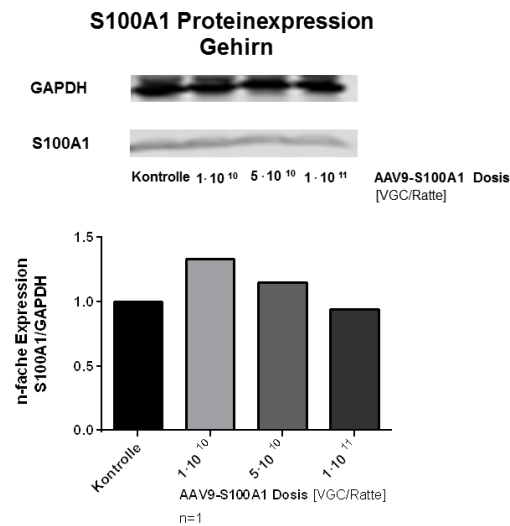


Abb.IV.10F

**Abbildung IV.10E - F: Dosisabhängige S100A1 Proteinexpression in der Milz und im Gehirn nach intravenöser Virus-Applikation bei Ratten**

oben: Darstellung des S100A1 im Western Blots ;

unten: Darstellung der dosisabhängigen S100A1 Proteinexpression (Mittelwerte + SEM).

## 1.4 Ergebnisse von Korrelationsanalysen

Um mögliche Auswirkungen einzelner Parameter aufeinander erfassen und darstellen zu können wurden einzelne Sinn gebende Korrelationsanalysen durchgeführt. Nach der jeweiligen Durchführung einer Korrelationsanalyse nach Pearson wurde der ebenfalls der dazugehörige T-Test.

So lag es nahe die injizierten Virus-Dosierungen mit der gemessenen Zahl an viralen Genomkopien in den Gewebeproben der untersuchten Organe in Korrelation zu setzen. Damit sollte überprüft werden, ob es einen statistischen Zusammenhang zwischen der injizierten Virus-Dosis und der Zahl an eingeschleusten viralen Genomkopien in den einzelnen Geweben gibt.

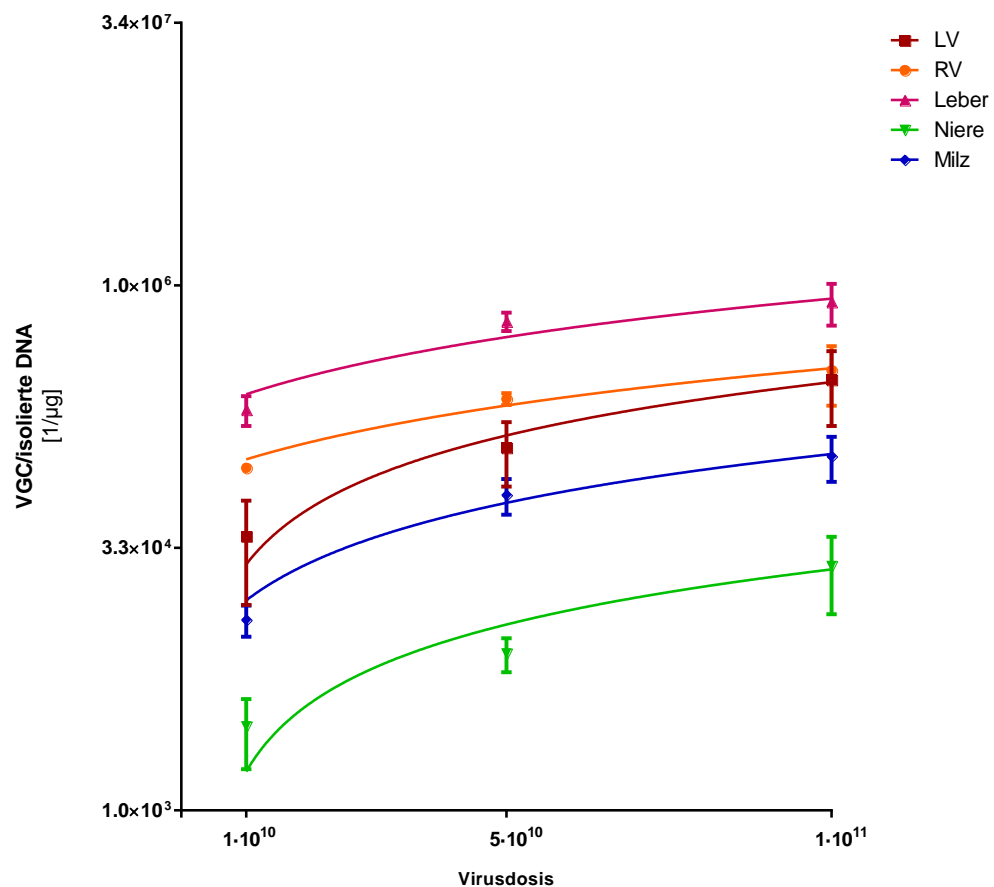
In allen Geweben außer dem Gehirn lag der Korrelationskoeffizient nah bei 1. Wegen der geringen Tierzahl (n=3) war der T-Test jedoch nicht signifikant.

Im Gehirn lag der Korrelationskoeffizient sehr dicht bei 0, jedoch konnte aufgrund  $n = 1$  keine Aussage getroffen werden. Die Werte zu dieser Korrelationsanalyse sind in der Tabelle IV.1 dargestellt.

**Tabelle IV.1: Korrelationskoeffizient nach Pearson für die intravenös applizierten Virus-Dosierungen vs. die in den Organen gemessenen Zahl an VGCs und das Ergebnis des zugehörigen T-Tests**

Virusdosis vs. VGCs						
	LV	RV	Leber	Niere	Milz	Gehirn
<b>Pearson r</b>	0,9904 (n=3)	0,9902 (n=3)	0,9573 (n=3)	0,9697 (n=3)	0,9930 (n=3)	0,02858 (n=3)
<b>Ergebnis P-Wert des T-Tests</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns

### Virusdosis vs. VGC



**Abbildung IV.11: Graphische Darstellung des Zusammenhangs der intravenös applizierten Virus-Dosis mit der gemessenen Zahl an viralen Genomkopien in Gewebeproben der untersuchten Organe von Ratten**

Es gab eine dosisabhängige Steigerung der VGCs im linken und rechten Ventrikel, in der Leber, der Niere und der Milz.

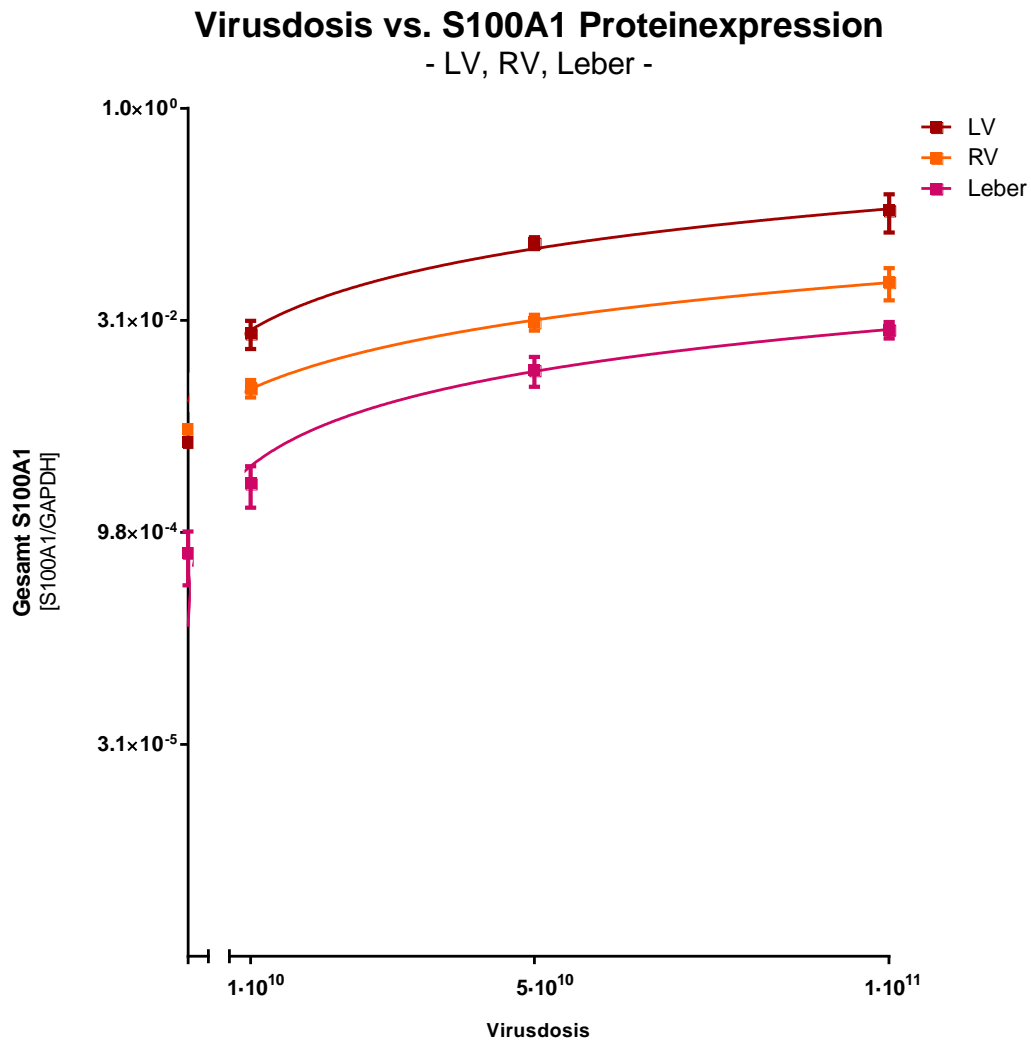
Es konnte graphisch ein positiver Zusammenhang der injizierten Virus-Dosis zur Zahl der viralen Genomkopien im linken und rechten Ventrikel, sowie in der Leber, der Niere und der Milz aufgezeigt werden. Die statistische Überprüfung ergab jedoch keine Signifikanz für die sich in den hohen Korrelationsfaktoren ( $>0,9$ ) abzeichnenden Zusammenhänge (s.Tab.IV.1). Trotzdem lässt die graphische Anordnung bzw. die Verteilung der Daten darauf schließen, dass die bei Ratten intravenös injizierte Virus-Dosis einen direkten positiven Einfluss auf die Zahl der viralen Genomkopien in den Organen LV, RV, Leber, Niere und Milz hat (s.Abb.IV.11).



Um den möglichen Effekt der unterschiedlichen Virus-Dosierungen auf den Gehalt des Zielproteins S100A1 in den untersuchten Organen darzustellen, wurde die Virus-Dosis in Korrelation zu der Proteinexpression gesetzt. Hierbei lag der Korrelationskoeffizient nach Pearson für die Organen linker und rechter Ventrikel, sowie der Leber sehr dicht bei 1. Der T-Test war dabei hochsignifikant (siehe Tabelle IV.2).

**Tabelle IV.2: Korrelationskoeffizient nach Pearson für die intravenös applizierten Virus-Dosierungen vs. S100A1 Proteinexpression und das Ergebnis des zugehörigen T-Tests**

<b>Virusdosis vs. Proteinexpression</b>			
	<b>LV</b>	<b>RV</b>	<b>Leber</b>
<b>Pearson r</b>	0,9965 (n=3)	0,9995 (n=3)	0,9991 (n=3)
<b>Ergebnis P-Wert des T-Tests</b>	**	***	***



**Abbildung IV.12: Graphische Darstellung des Zusammenhangs der intravenös applizierten Virus-Dosis mit der S100A1 Proteinexpression in den Organen LV und RV des Herzens und der Leber von Ratten**

Es konnte eine Steigerung der Proteinexpression mit zunehmender Virusdosis im LV, RV und der Leber nachgewiesen werden. Die auf der Y-Achse eingezeichneten Werte entsprechen der endogenen S100A1 Proteinexpression der Kontrolltiere.

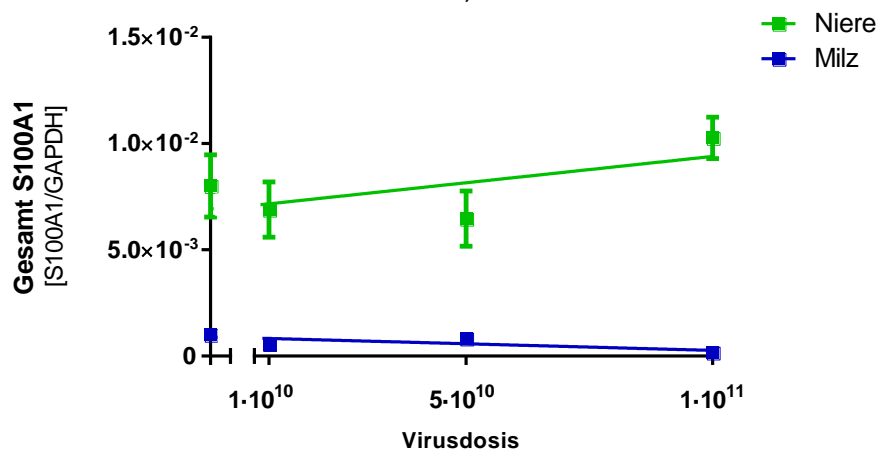
Daraus lässt sich eine Abhängigkeit der Menge an exprimierten S100A1-Protein von der injizierten Virus-Dosis ableiten. Wie in Abbildung IV.12 erkennbar, steigt die Proteinexpression nicht linear, sondern nähert wie eine Sättigungskurve sich einem Plateau-Wert an. Aufgrund dessen kann davon ausgegangen werden, dass mit weiteransteigender injizierter Virus-Dosis nur eine zunehmend schwächere Proteinexpression erreicht werden kann.

In der Niere lag der Korrelationskoeffizient nach Pearson bei 0,663, der T-Test war aber nicht signifikant. In der Milz lag ein negativer Korrelationskoeffizient nach Pearson bei -0,78, mit einem ebenfalls nicht signifikanten T-Test. Die Werte werden in Tabelle IV.3 dargestellt.

**Tabelle IV.3: Korrelationskoeffizient nach Pearson für die intravenös applizierten Virus-Dosierungen vs. S100A1 Proteinexpression und das Ergebnis des zugehörigen T-Tests**

Virusdosis vs. Proteinexpression		
	Niere	Milz
<b>Pearson r</b>	0,6630 (n=3)	-0,7800 (n=3)
<b>Ergebnis P-Wert des T-Tests</b>	ns	ns

### Virusdosis vs. S100A1 Proteinexpression - Niere, Milz -



**Abbildung IV.13: Graphische Darstellung des Zusammenhangs der intravenös applizierten Virus-Dosis und der S100A1 Proteinexpression in der Niere und der Milz von Ratten**

Eine tendenzielle Steigerung der Proteinexpression mit zunehmender Virus-Dosis deutet sich in der Niere an. In der Milz konnte kein sinnvoller Zusammenhang festgestellt werden. Die auf der Y-Achse eingezeichneten Werte entsprechen der endogenen S100A1 Proteinexpression der Kontrolltiere.

Wie in der Abbildung IV.13 erkennbar, führt eine höhere Virus-Dosis in der Niere nicht sehr eindeutig zu einer Steigerung der S100A1 Proteinexpression. Für die Milz lässt keinerlei sinnvoller Zusammenhang zwischen Virus-Dosis und S100A1 Proteinexpression erkennen. Dies spiegelt sich auch in den Korrelationskoeffizienten wieder. Dieses Ergebnis spiegelt sich in den Daten zur Menge der humanen S100A1 mRNA (s.Abb.IV.16A-C) und der S100A1 Proteinexpression (s.Abb.IV.10D+E) in diesen dieser Organe wieder.

Da davon auszugehen ist, dass die Blutversorgung der einzelnen Organe recht unterschiedlich ist (s.Tab.IV.4) (PETERS, 2012) wurde nach einem Zusammenhang zwischen der organspezifischen Zahl an viralen Genomkopien und der Blutflussrate der einzelnen Organe gesucht. Es sollte untersucht werden, ob eine höhere Durchblutung zu einer höheren Anzahl an viralen Genomkopien in den untersuchten Organen führt.

**Tabelle IV.4: Blutflussraten der einzelnen Organe der Sprague-Dawley Ratte (modifiziert nach (PETERS, 2012))**

<b>Organ</b>	<b>Blutflussrate (ml/min/kg KGW)</b>
<b>Milz</b>	5
<b>Gehirn</b>	5,32
<b>RV / LV</b>	15,68
<b>Niere</b>	36,92
<b>Leber</b>	80

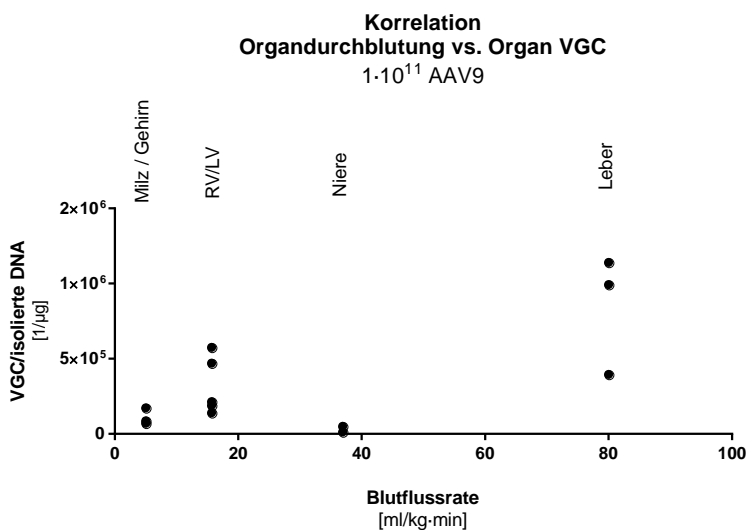
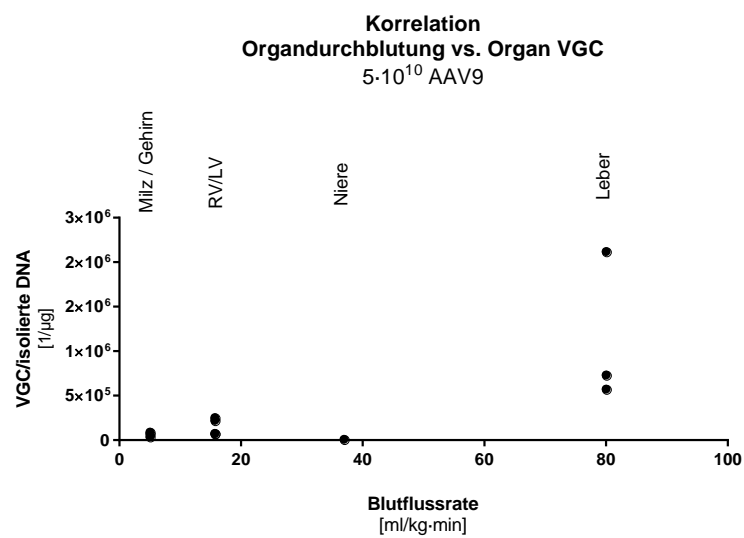
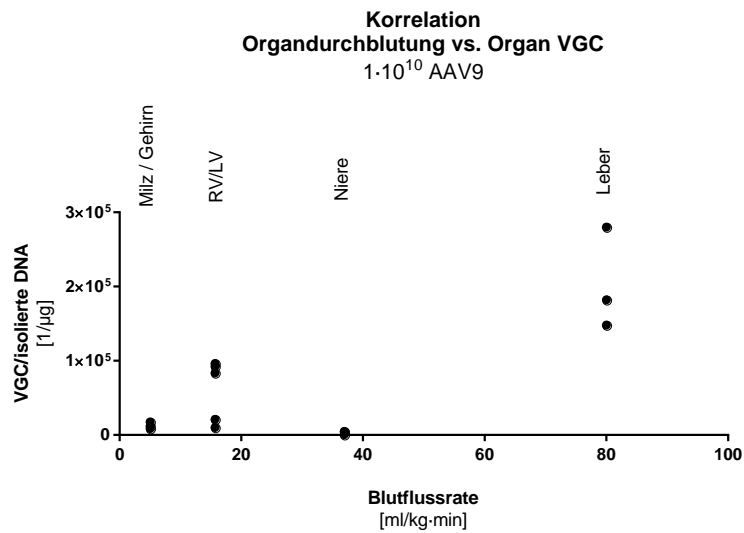
Der Korrelationskoeffizient nach Pearson lag bei allen drei Virus-Dosierungen zwischen 0,6 und 1. Der T-Test war signifikant (siehe Tabelle IV.5).

**Tabelle IV.5: Korrelationskoeffizient nach Pearson für die organspezifische Durchblutung vs. der in den Organen gemessenen Zahl an VGCs und das Ergebnis des zugehörigen T-Tests**

Organdurchblutung vs. VGCs			
Dosis	$1 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^{11}$
Pearson r	0,7539 (n=3)	0,7252 (n=3)	0,6640 (n=3)
Ergebnis P-Wert des T-Tests	**	**	**

Dadurch konnte gezeigt werden, dass es offensichtlich einen positiven Zusammenhang zwischen der Durchblutungsrate eines Organs und der darin nachgewiesenen Zahl an viralen Genomkopien gibt. In Organen mit höherer Durchblutung (z.B. der Leber) wurden mehr virale Genomkopien nachgewiesen als in Organen mit einer geringen Durchblutung (z.B. Milz).

Die einzige – derzeit nicht erklärbare - Ausnahme stellte die Niere dar, in der trotz höherer Durchblutung nur eine geringe Anzahl an viralen Genomkopien nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung IV.14A - C: Graphische Darstellung des Zusammenhangs zwischen der Organdurchblutung mit der Zahl an gemessenen viralen Genomkopien in den untersuchten Geweben bei den drei applizierten Virus-Dosierungen bei Ratten**

Eine Beziehung zwischen der Organdurchblutung und der Zahl an viralen Genomkopien stellt sich in den meisten der untersuchten Organe dar. Allein die Befunde bei der Niere passen nicht zu diesem Zusammenhang.

## 1.5 Ergebnisse von immunhistologischen Färbungen an Gewebeschnitten des Herzens

Zur Beurteilung des Anteils und der Verteilung von S100A1 exprimierenden Zellen im linken und rechten Ventrikel des Herzens, dem eigentlichen Zielorgan des therapeutischen Gentransfers, wurden von diesen Organteilen Gewebeschnitte angefertigt und eine immunhistologische Färbung durchgeführt.

Die S100A1 exprimierenden Zellen wurden mit Hilfe dieser Technik braun angefärbt und konnten dadurch identifiziert und von den anderen Zellen unterschieden werden. Sie wurden über den prozentualen Anteil ihrer Färbung an der Gesamtfläche des Gewebeschnittes mit Hilfe der Software ImageJ quantifiziert.

So konnte im linken und im rechten Ventrikel eine Vergrößerung des S100A1 exprimierenden Areals mit zunehmender Virus-Dosis nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil an S100A1 exprimierenden Zellen war im linken Ventrikel bei allen drei Virus-Dosierungen andeutungsweise größer als im rechten Ventrikel. Im linken Ventrikel konnte außerdem beim S100A1 exprimierenden Areal ein signifikanter Unterschied zwischen höchster und niedrigster Virus-Dosis mit ( $p < 0,05$ ) festgestellt werden (siehe Abb.IV.15A).

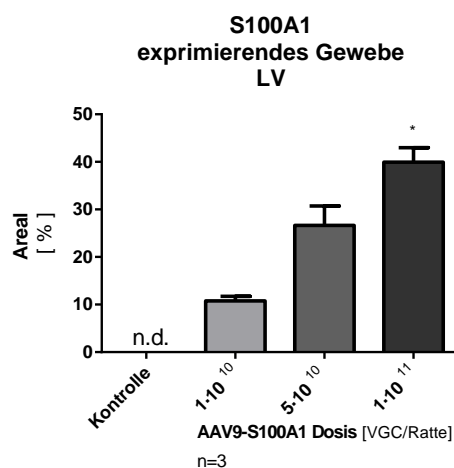


Abb.IV.15A

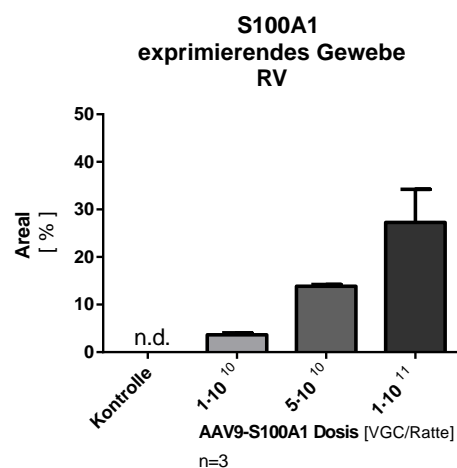
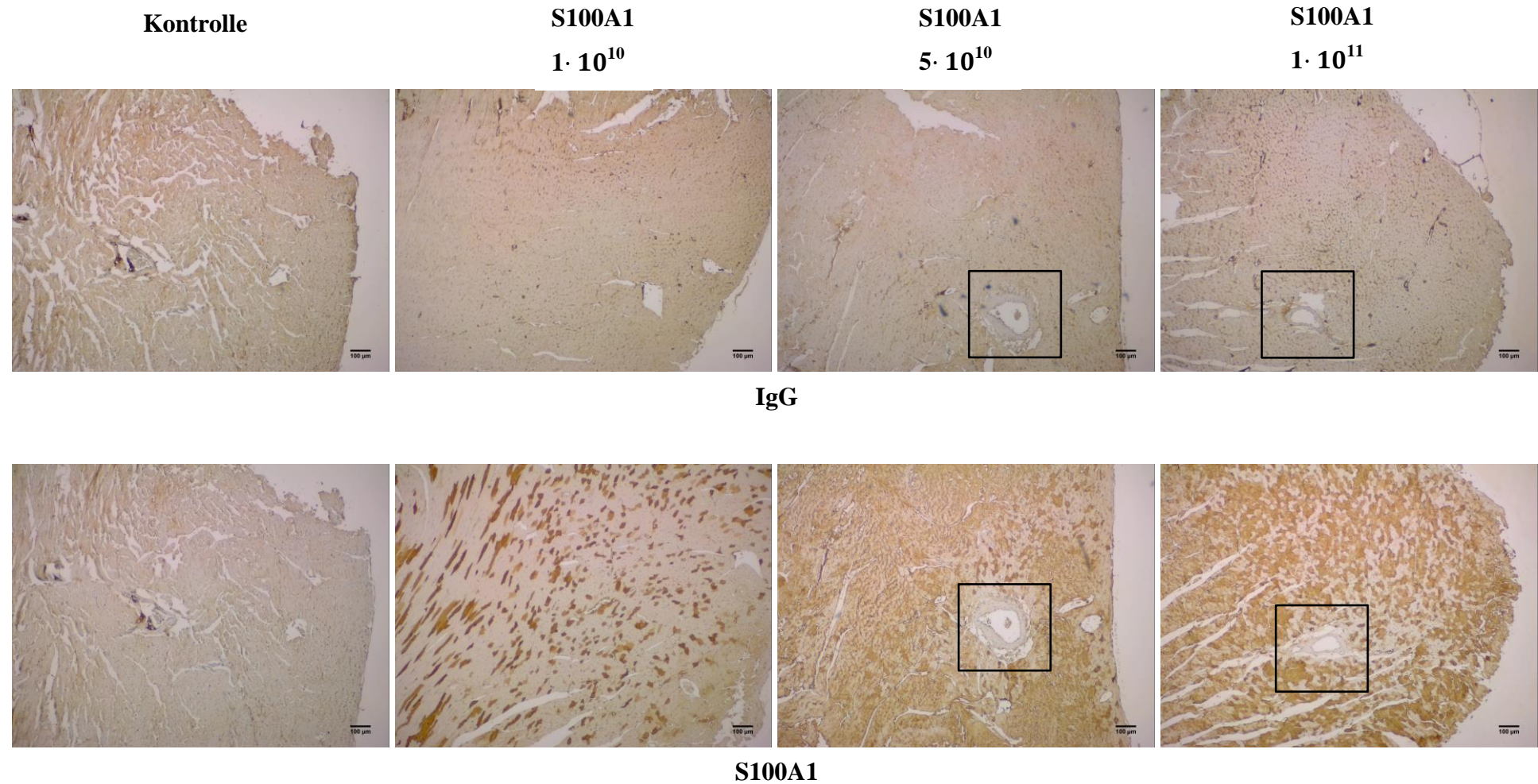


Abb.IV.15B

### Abbildung IV.15A + B: Graphische Darstellung des S100A1 exprimierenden Areals in Gewebeschnitten vom LV und RV des Rattenherzens

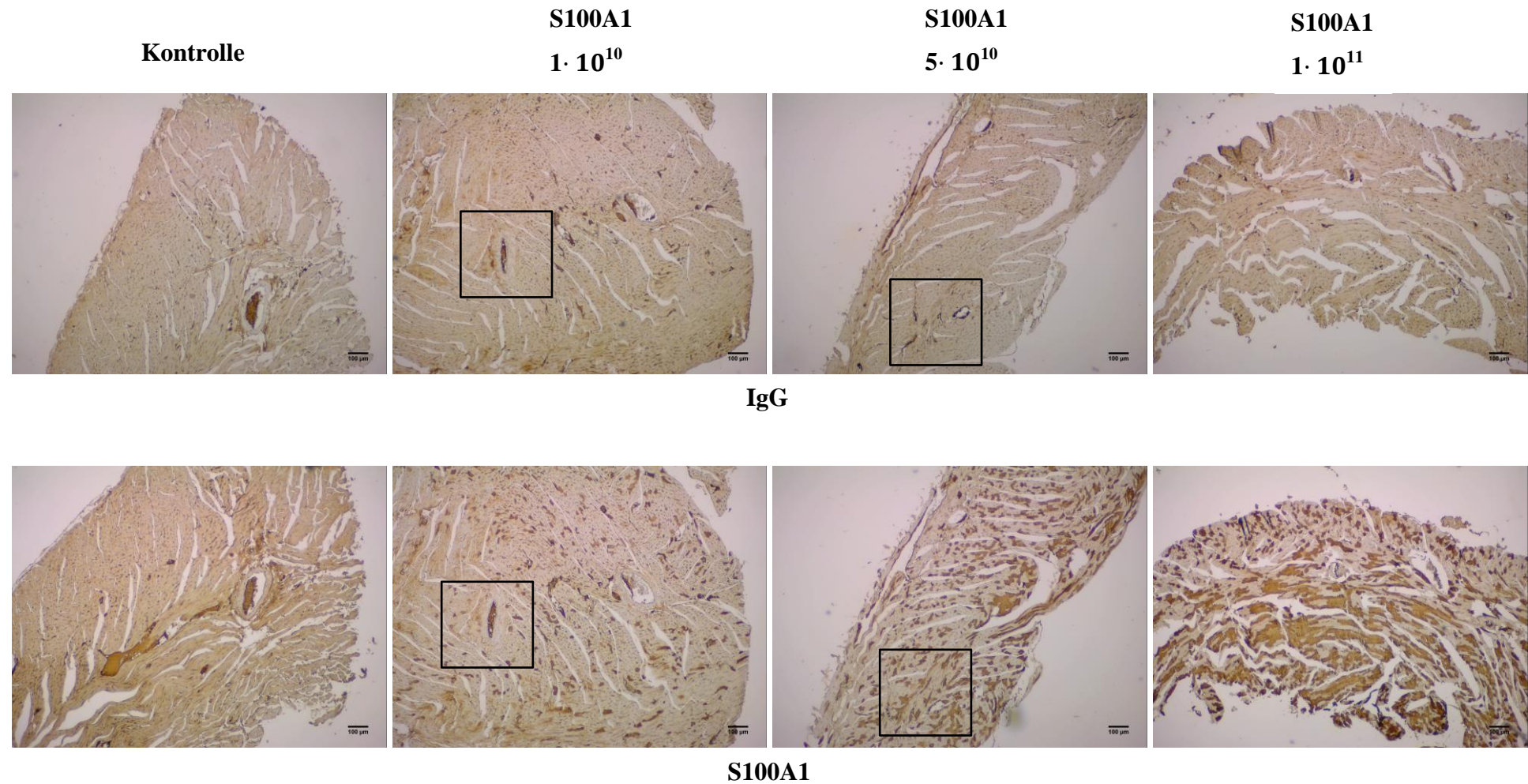
Der prozentuale Anteil des S100A1 exprimierenden Areals zur Gesamtfläche der Gewebeschnitte vergrößerte sich deutlich mit zunehmender Virusdosis in beiden Organteilen (mit \*  $p < 0,05$  signifikant, verglichen mit der Dosis  $1 \cdot 10^{10}$ , Mittelwerte + SEM).



**Abbildung IV.16: Immunhistologisch gefärbte Gewebeschnitte des LV des Rattenherzens bei 4-facher Vergrößerung**

Gewebeschnitte mit IgG-Färbung als Kontrollfärbung zur besseren Darstellung der S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten mit der S100A1-Färbung für ein unbehandeltes Kontrolltier und alle drei Virus-Dosierungen (Balken entspricht 100 µm). Die umrandeten Bereiche sind aufgrund der enthaltenen Gefäße als Ausschnittsvergrößerung auf Seite 89 zu sehen.





**Abbildung IV.17: Immunhistologisch gefärbte Gewebeschnitte des RV des Rattenherzens bei 4-facher Vergrößerung**

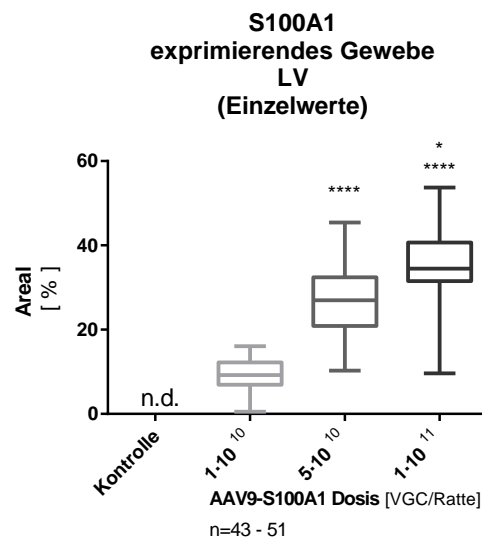
Gewebeschnitte mit IgG-Färbung als Kontrollfärbung zur besseren Darstellung der S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten mit der S100A1-Färbung für ein unbehandeltes Kontrolltier und alle drei Virus-Dosierungen (Balken entspricht 100 µm). Die umrandeten Bereiche sind aufgrund der enthaltenen Gefäße als Ausschnittsvergrößerung auf Seite 90 zu sehen.

Um die Verteilung der S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten in den Gewebeschnitten beurteilen zu können, wurde mit Hilfe der Software Image J ein Gitter über die Fotos der Gewebeschnitte gelegt und diese in einzelne Raster unterteilt. Für die Gewebeschnitte des linken Ventrikels wurden 43 – 51 Raster verwendet. Für die des rechten Ventrikels wurden aufgrund der geringeren Größe der Gewebeschnitte nur 16 – 19 Raster benötigt.

Diese Raster wurden wie das Gesamtbild analysiert, in dem der prozentuale Anteil der gefärbten, S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten quantifiziert wurde. Dabei wurden die Raster mit geringem oder großem Gewebeanteil gleich gewertet. Die Ergebnisse dieser Raster-Analyse werden im Folgenden als Einzelwerte bezeichnet.

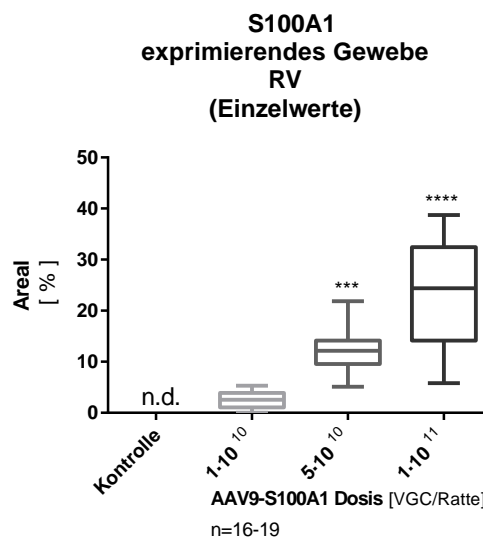
Durch die Quantifizierung des prozentualen Anteils des Areals an S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten in den einzelnen Rastern wurden erste Hinweise auf die Verteilung dieser Zellen im LV und RV gefunden. Dabei wurde ebenfalls ein Anstieg an S100A1 exprimierenden Zellen im linken und rechten Ventrikel beobachtet. Wie in Abbildung IV.18 dargestellt gab es im linken Ventrikel einen hochsignifikanten Unterschied ( $p < 0,0001$ ) des prozentualen Anteils an exprimierenden Kardiomyozyten bei der mittleren und der höchsten Virus-Dosis im Vergleich zur niedrigsten Virus-Dosis. Ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,0086$ ) konnte auch zwischen der mittleren und höchsten Virusdosis nachgewiesen werden. Im rechten Ventrikel wurde ein hochsignifikanter Unterschied ( $p < 0,0001$ ) der mittleren und höchsten Virus-Dosis im Vergleich zu niedrigsten Virus-Dosis (siehe Abb.IV.19).

Zusätzlich wurde gezeigt, dass es mit ansteigender Virus-Dosis Unterschiede in der Verteilung der S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten gibt. Im linken und rechten Ventrikel zeigte sich eine größere Streuung an S100A1 exprimierenden Zellen mit zunehmender Virus-Dosis, was für eine unregelmäßige Verteilung der Zellen sprechen würde. Dieses Ergebnis wird ebenfalls in den Abbildungen IV.13 und 14 mit Hilfe von Boxplots graphisch dargestellt. In den Boxen werden 50 % der Daten dargestellt. Das bedeutet, je größer die Ausdehnung der Box, desto größer ist die Streuung der Daten. Der Medianwert ist dabei als durchgehender Strich in der Box eingezeichnet. Zusätzlich werden das Minimum und Maximum der Daten durch die Enden der eingezeichneten Antennen dargestellt.



**Abbildung IV.18: Einzelwerte des S100A1 exprimierenden Areals im LV des Rattenherzens**

Das Ausmaß der Ausdehnung der Box gibt Hinweise auf die Streuung der S100A1 exprimierenden Zellen. Dadurch wird eine größere Streuung an S100A1 exprimierenden Zellen bei ansteigender Virus-Dosis erkennbar (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  gegenüber Virus-Dosis  $1 \cdot 10^{10}$ , \*  $p < 0,0086$  gegenüber Virus-Dosis  $5 \cdot 10^{10}$ ; dargestellt als Box-Plot mit angegebenem Min und Max).



**Abbildung IV.19: Einzelwerte des S100A1 exprimierenden Anteils im RV des Rattenherzens**

Das Ausmaß der Ausdehnung der Box gibt Hinweise auf die Streuung der S100A1 exprimierenden Zellen. Aufgrund dessen konnte eine größere Streuung an S100A1 exprimierenden Zellen bei ansteigender Virus-Dosis nachgewiesen werden (\*\*\*/\*  $p < 0,0001$  gegenüber Virus-Dosis  $1 \cdot 10^{10}$  dargestellt als Box-Plot mit angegebenem Min und Max).

Zur Beurteilung des Verteilungsmusters der S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten im linken und rechten Ventrikel wurden die Einzelwerte pro Raster gemittelt, ins Verhältnis zu den Werten der Gesamtschnittfläche gesetzt und davon die Standardabweichung berechnet.

Im linken Ventrikel konnte eine deutliche Abnahme der mittleren Standardabweichung mit der Zunahme der Virus-Dosis verzeichnet werden. Dabei war die mittlere Standardabweichung der S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten bei der höchsten Dosis zur niedrigsten Dosis signifikant niedriger (siehe Abb.IV.20A). D. h. die Verteilung der S100A1 exprimierenden Zellen wird mit zunehmender Virus-Dosis im LV homogener. Im rechten Ventrikel konnte keine eindeutige Virus-dosisabhängige Veränderung der mittleren Standardabweichung aufgezeigt werden. Folglich auch keine zunehmende homogene Verteilung der S100A1 exprimierenden Zellen.

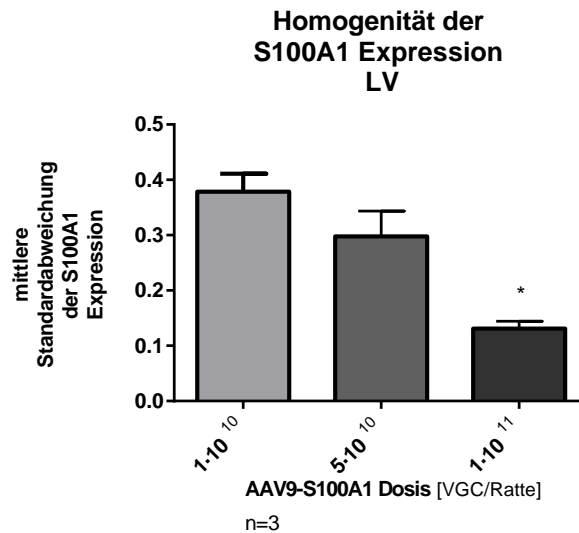


Abb.IV.20A

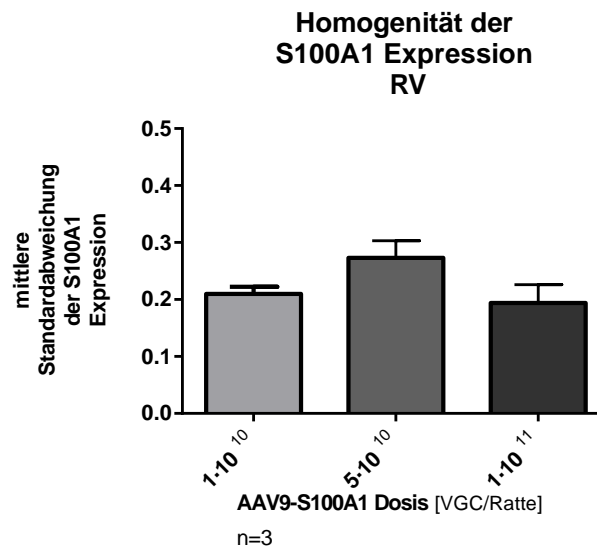


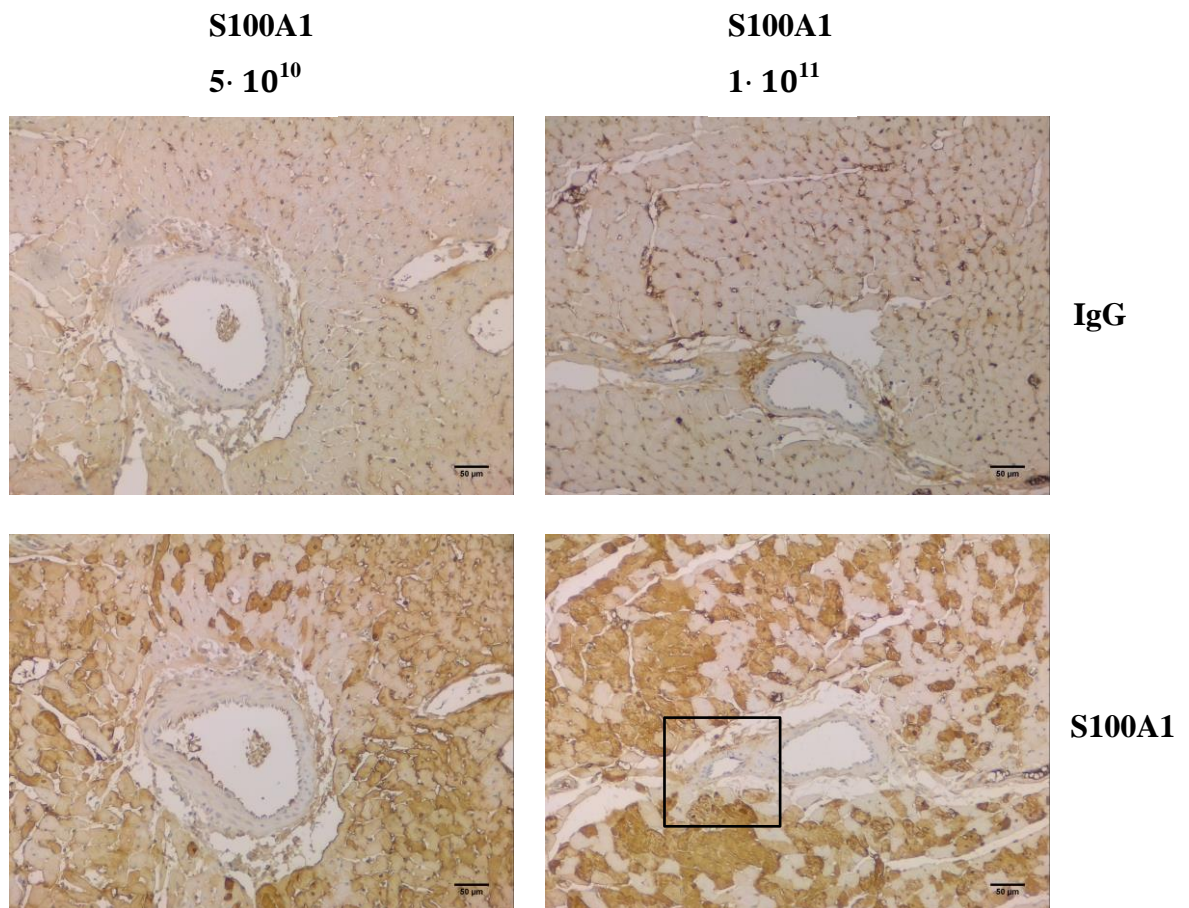
Abb.IV.20B

**Abbildung IV.20A + B: Mittlere Standardabweichung aller mittels Gesamtmittelwerte relativierten S100A1 exprimierenden Zellen zur Darstellung deren Homogenität in Gewebeschnitten vom LV und RV des Rattenherzens**

Abnahme der Standardabweichung mit zunehmender Virus-Dosis im LV. Kein dosisabhängiger Effekt auf die Standardabweichung im RV(\*  $p < 0,05$  gegen Dosis  $1 \cdot 10^{10}$ , Mittelwerte + SEM).

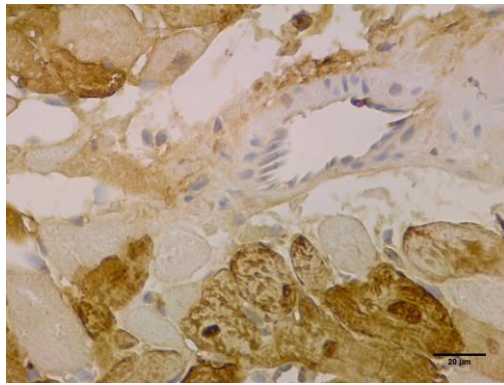


In den immunhistologisch gefärbten Gewebeschnitten der beiden Ventrikel des Herzens (Abb.IV.21+22) konnte außerdem gezeigt werden, dass die Endothelzellen der Gefäße im LV und RV keine Expression von S100A1 zeigen, auch nicht bei ansteigender Virus-Dosis.



**Abbildung IV.21A: Gefäßdarstellung in immunhistologisch gefärbten LV-Gewebeschnitten des Rattenherzens bei 10-facher Vergrößerung**

Gefäße in Gewebeschnitten des LV bei mittlerer und höchster Virus-Dosis. Es konnte keine S100A1 Expression in Endothelzellen nachgewiesen werden (Balken entspricht 50 µm). Der umrandete Bereich ist als Ausschnittsvergrößerung auf S.90 zu sehen.



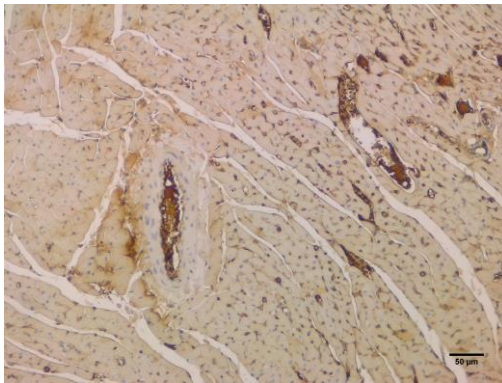
**Abbildung IV.21B: Gefäßdarstellung im immunhistologisch gefärbten LV-Gewebeschnitt des Rattenherzens LV bei 40-facher Vergrößerung**

Ein Gefäß in einem Gewebeschnitt des LV bei höchste Virus-Dosis des LV. Die S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten lassen sich deutlich von den nicht transduzierten Endothelzellen unterscheiden (Balken entspricht 20 µm).

**S100A1**

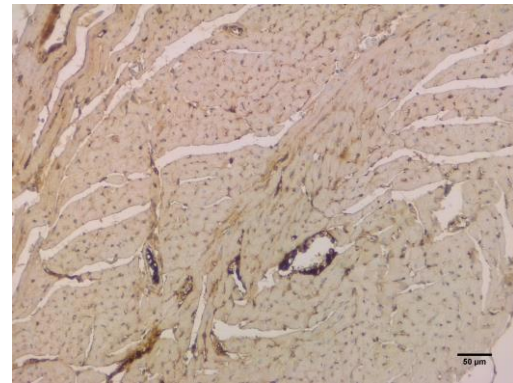
**1 · 10<sup>10</sup>**

**IgG**

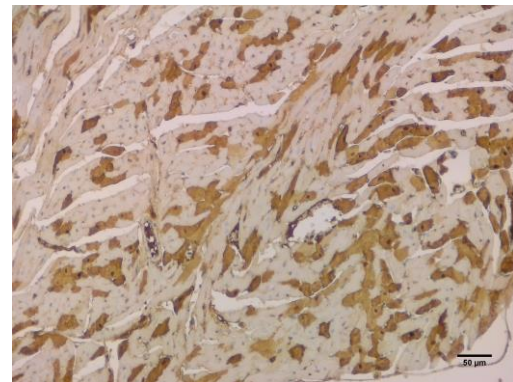
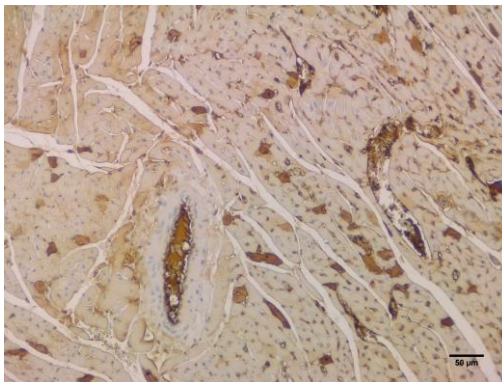


**S100A1**

**5 · 10<sup>10</sup>**



**S100A1**



**Abbildung IV.22: Gefäßdarstellung in immunhistologisch gefärbten RV-Gewebeschnitten des Rattenherzens bei 10-facher Vergrößerung**

Gefäße in Gewebeschnitten des RV bei mittlerer und höchster Virus-Dosis des RV. Es konnte keine S100A1 Expression in Endothelzellen nachgewiesen werden (Balken entspricht 50 µm).

## **2. Ergebnisse zu den Nebenwirkungen des intravenösen Gentransfers**

### **2.1 Laboranalytisch erfasste Blutparameter**

Bei Prüfung der intravenösen AAV9-CMV/MLC260-S100A1 Virusinjektion für die Gentherapie als gut praktikable Applikationsmethode sollten mögliche Nebenwirkungen der systemischen Virusgabe auf den Körper anhand der Konzentrationsveränderung diverser Blutparametern erfasst und dargestellt werden. Die Blutentnahme erfolgte im Rahmen der finalen Untersuchungen an Tag 42 nach intravenöser Virusapplikation.

#### **2.1.1 Elektrolyte**

Es wurden die Gehalte der Elektrolyte Natrium, Kalium, Calcium und Chlorid im Heparinplasma laboranalytisch erfasst. Dadurch sollte überprüft werden, ob der systemische Gentransfer längerfristige Auswirkungen auf den Wasser- und Elektrolyt-Haushalt haben kann. Die Niere ist ein wichtiges Regulationsorgan für Elektrolyte im Blut, dadurch können deren Konzentrationswerte indirekt auch einen Anhaltspunkt für die Nierenfunktion geben.

Allein beim Calcium wurde nach intravenöser Applikation der höchsten Virus-Dosis ein signifikanter Konzentrationsunterschied im Vergleich zur Kontrolle festgestellt (siehe Abb.IV.23C). Alle anderen Elektrolytwerte blieben von den Virusapplikationen unbeeinflusst.



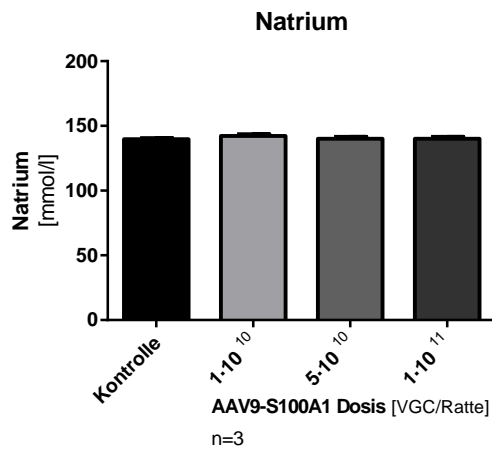


Abb.IV.23A

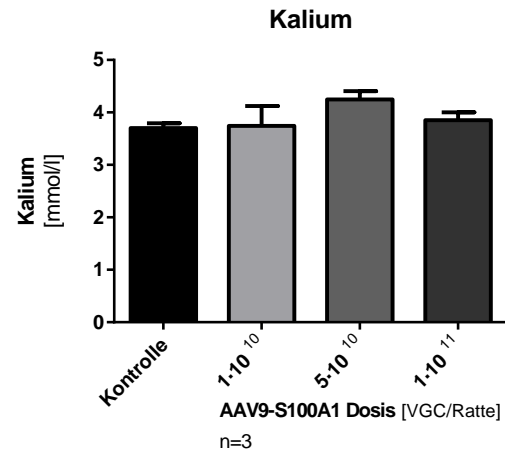


Abb.IV.23B

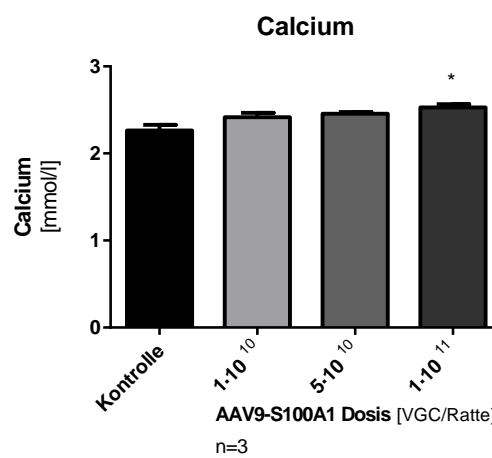


Abb.IV.23C

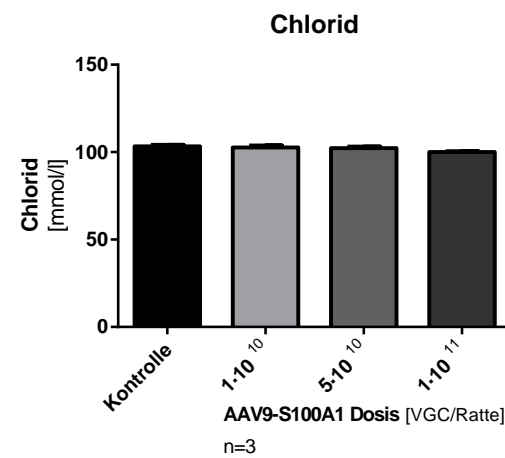


Abb.IV.23D

**Abbildung IV.23A - D: Gehalte der Blutplasmaelektrolyte bei Ratten an Tag 42 nach intravenöser NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation**

Signifikante Erhöhung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes nach der höchsten Virusapplikation im Vergleich zu den Werten der Kontrollgruppe. Alle übrigen Elektrolyte zeigen keine Auswirkungen der applizierten Virus-Dosierungen (\*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle, Mittelwerte + SEM).

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der systemische Gentransfer mittels ansteigender Virus-Dosierungen keine wichtigen Auswirkungen auf den Wasser-Elektrolyt-Haushalt oder die Niere am Tag 42 nach der Virusapplikation hat.

## 2.1.2 Leberfunktionsparameter

Um eine Schädigung der Leber zu überprüfen, wurden die Aktivität der Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST), sowie der Gehalt an Albumin im Citratplasma bestimmt. Bei Zellschädigung und Störung der Membranfunktion kommt es zu einer vermehrten Freisetzung dieser und anderer Enzyme aus den Hepatozyten und dadurch zu einer Erhöhung deren Aktivität im Blut. Das Plasmaprotein Albumin wird in der Leber hergestellt und gilt daher als Marker für eine Synthesestörung der Leber, z.B. beim Vorliegen einer Hypoalbuminämie. Die Aktivitätswerte von ALT und AST zeigten keinen durch die intravenöse Virusapplikation verursachten Effekt (siehe Abb.IV.24A+B), bei Albumin kam es zu einem geringen Konzentrationsanstieg, der bei der höchsten Virus-Dosis im Vergleich zur Kontrolle signifikant war, wie in Abb.IV.24C dargestellt. Es lässt sich also feststellen, dass am Tag 42 nach Virusapplikation keine wesentliche Beeinträchtigung der Leberfunktion feststellbar war.

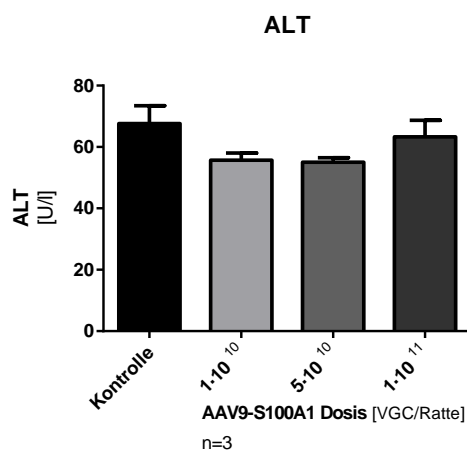


Abb.IV.24A

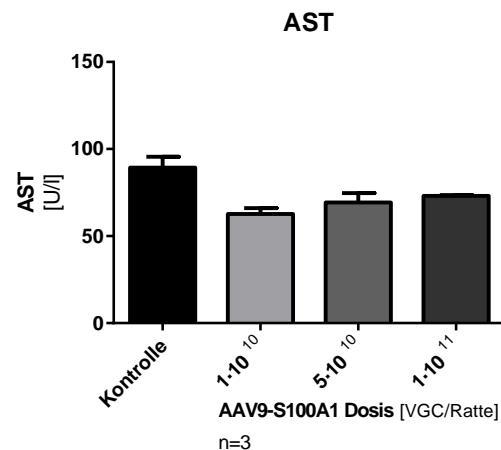


Abb.IV.24B

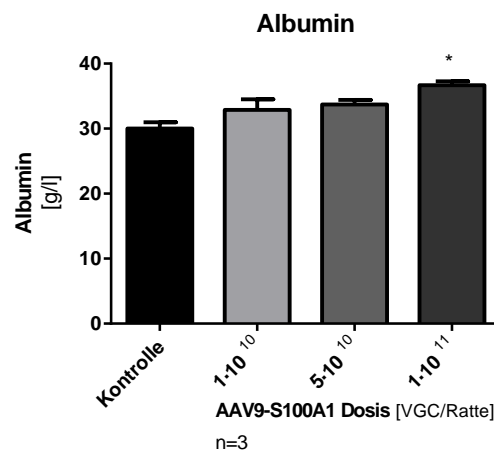


Abb.IV.24C

### Abbildung IV.24A - C: Leberfunktionswerte bei Ratten am Tag 42 nach intravenöser NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation

Keine Veränderungen der Leberenzyme bei ansteigenden Virus-Dosierungen nachweisbar. Das Plasmaprotein Albumin zeigte eine signifikante Konzentrationszunahme bei der höchsten Virus-Dosis (\*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle, Mittelwerte + SEM).

### **2.1.3 Blutgerinnungsparameter**

Um die Möglichkeit einer Beeinflussung der Blutgerinnung durch die intravenöse Virusinjektion am Tag 42 p.i. zu beurteilen, wurden verschiedene Parameter im Citratplasma bestimmt. So dient der Quick-Wert für die Funktionsbeurteilung des extrinsischen, also exogenen, Gerinnungssystems. Er kann durch die Messung der Thromboplastinzeit bestimmt werden. Fibrinogen ist ein Glykoprotein, das in der Leber hergestellt wird und eine wichtige Rolle in der Gerinnungskaskade spielt. Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) wird für die Beurteilung des intrinsischen, also endogenen, Gerinnungssystem verwendet. Alle genannten Parameter können auch für die Beurteilung der Leberfunktion mit herangezogen werden, da die meisten Gerinnungsfaktoren in der Leber synthetisiert werden. Die Werte von Quick und Fibrinogen zeigten im Vergleich zu den Kontrollwerten keinerlei Veränderung nach der intravenösen Applikation ansteigender Virus-Dosierungen (siehe Abb.IV.25A+B). Die aPTT zeigte bei der mittleren Virus-Dosis einen nicht signifikanten Anstieg. Die Werte sanken aber bei der höchsten Virus-Dosis wieder auf das Kontrollniveau ab, wie in Abb.IV.25C gezeigt wird. D.h. es konnten keine Auswirkungen der intravenösen Virusapplikation auf die Blutgerinnung nachgewiesen werden.

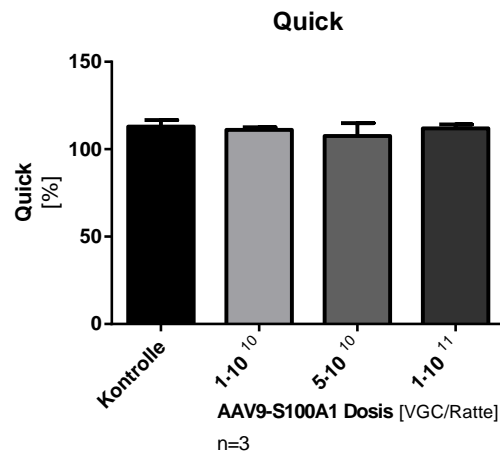


Abb.IV.25A

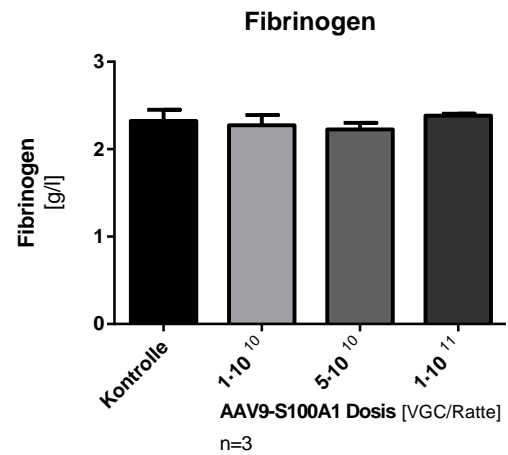


Abb.IV.25B

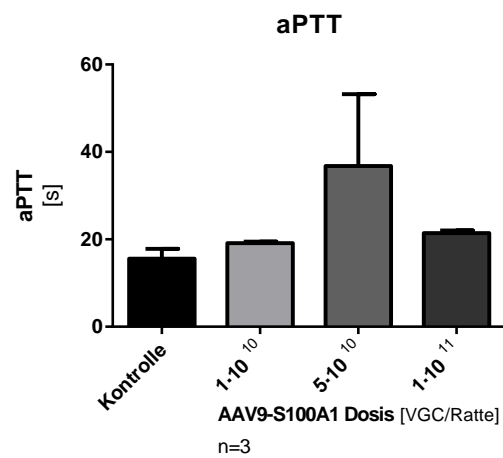


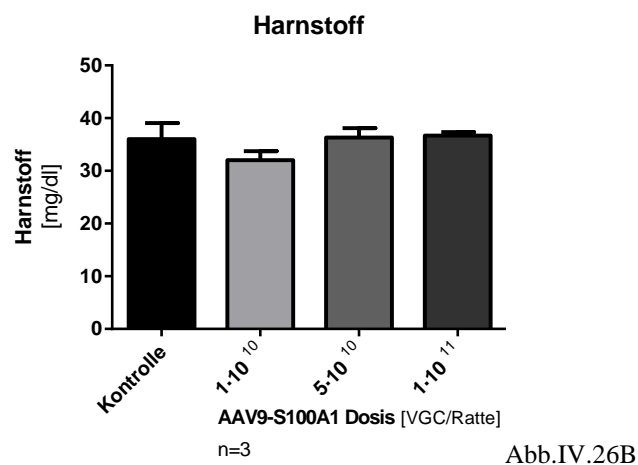
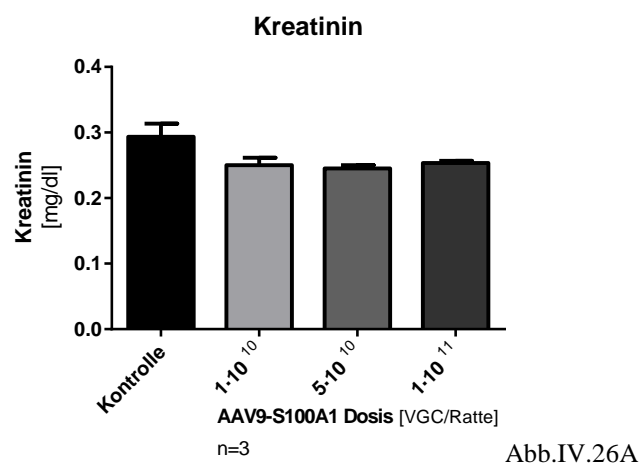
Abb.IV.25C

**Abbildung IV.25A – C: Blutgerinnungsparameter bei Ratten am Tag 42 nach intravenöser NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation**

Es gab keinen dosisabhängigen Effekt auf die Werte des Quick und Fibrinogens. Die aPTT zeigte einen nicht signifikanten Anstieg bei der mittleren Virusdosis (Mittelwerte + SEM).

### 2.1.4 Nierenfunktionsparameter

Als Funktionsparameter der Niere wurden die Konzentrationen von Kreatinin und von Harnstoff im Heparinplasma bestimmt. Die Niere dient im Körper als Ausscheidungsorgan für Giftstoffe und Abbauprodukte. Kreatinin ist ein Abbauprodukt des Kreatins im Muskelstoffwechsel und wird kontinuierlich über den Urin ausgeschieden. Harnstoff ist das Endprodukt des leberspezifischen Harnstoffzyklus und dient vorwiegend der Stickstoffausscheidung über den Urin. Die Harnstoffmenge im Blut eignet sich deshalb für die Darstellung einer Nierenfunktionsstörung. Wie in den Abb.IV.26A + B dargestellt, zeigten sich weder bei den Kreatinin – noch bei den Harnstoff-Konzentrationswerten im Blutplasma Auswirkungen der intravenös applizierten ansteigenden Virus-Dosierungen. D.h. zum Zeitpunkt der Untersuchung konnten keine Anzeichen für eine Funktionsstörung der Niere gefunden werden.



**Abbildung IV.26A + B: Nierenfunktionswerte bei Ratten am Tag 42 nach intravenöser NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation**

Keine Veränderungen der Konzentrationswerte von Kreatinin und Harnstoff bei ansteigender Virus-Dosis feststellbar (Mittelwerte + SEM).

## 2.2 Parameter der Herzfunktion

Linksventrikulären Druck-Volumen Messungen wurden für die Untersuchung der Herzfunktion benutzt. Als Parameter für die systolische Herzfunktion dienten der Endsystolische Druck (ESP) und die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $dp/dt \max$ ). Für die Beurteilung der diastolischen Herzfunktion dienten der Enddiastolische Druck (EDP), die minimale linksventrikuläre Druckabfallsgeschwindigkeit ( $dp/dt \min$ ) und der errechnete Parameter Tau Glantz, der die Relaxationszeit des LV angibt.

Die Meßergebnisse zu diesen verschiedenen Parametern (siehe Tab.IV.6) zeigten zwar nach intravenöser Virusapplikation im Vergleich zu den Kontrolltieren vereinzelt gewisse tendenzielle Veränderungen (siehe Abb.IV.27A+B, und Abb.IV.28A-C) von denen jedoch keine signifikant war.

**Tabelle IV.6: Parameter der systolischen und diastolischen Herzfunktion bei Ratten an Tag 42 nach der intravenösen NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation**

Parameter		Kontrolle	$1 \cdot 10^{10}$	$5 \cdot 10^{10}$	$1 \cdot 10^{11}$
<b>Herzfrequenz</b> [bpm]	Mittelwert (n=3)	284,2	351,0	365,7	274,6
<b>ESP</b> [mmHg]	Mittelwert (n=3)	99,38	115,3	121,8	131,8
<b><math>dp/dt \max</math></b> [mmHg/sec]	Mittelwert (n=3)	7986	10807	11103	8140
<b>EDP</b> [mmHg]	Mittelwert (n=3)	-2,329	2,371	5,764	8,279
<b><math>dp/dt \min</math></b> [mmHg/sec]	Mittelwert (n=3)	-6868	-8387	-8674	-7412
<b>Tau Glantz</b> [msec]	Mittelwert (n=3)	11,01	9,089	10,22	12,31

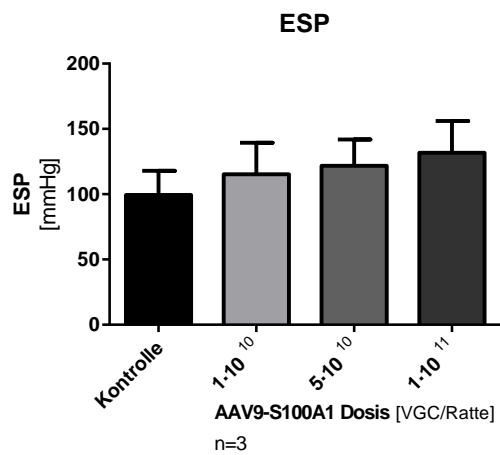


Abb.IV.27A

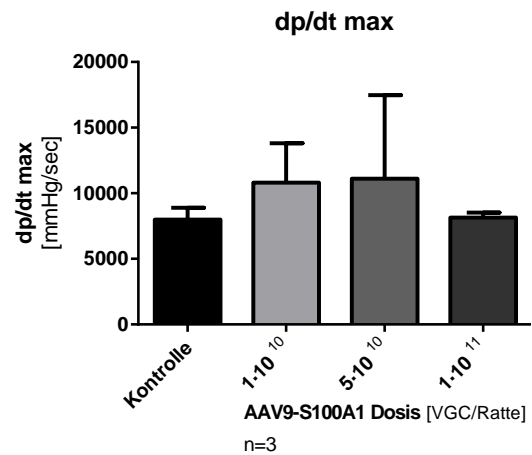


Abb.IV.27B

**Abbildung IV.27A + B: Parameter der systolischen Herzfunktion bei Ratten am Tag 42 nach intravenöser NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation**

A) Tendenzieller Anstieg des endsystolischen Druckes mit zunehmender Virusdosis;

B) Tendenziell vorübergehender Anstieg der dp/dt max bis zur mittleren Dosis, dann wieder ein Abfall (Mittelwerte + SEM).

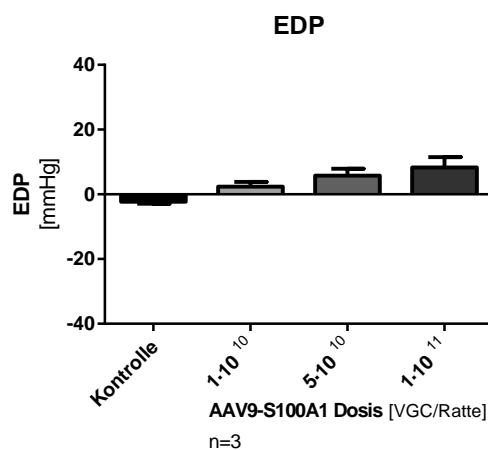


Abb.IV.28A

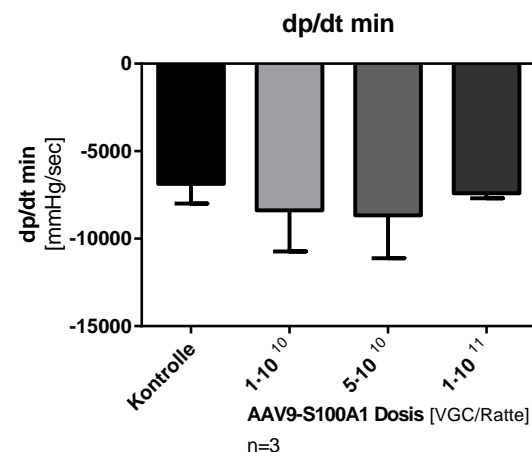


Abb.IV.28B

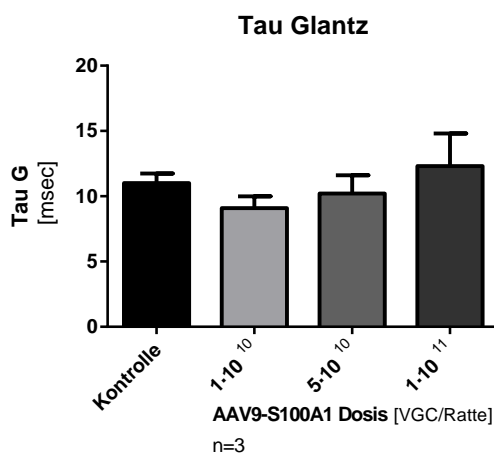


Abb.IV.28C

**Abbildung IV.28A - C: Parameter der diastolischen Herzfunktion bei Ratten am Tag 42 nach intravenöser NaCl- (Kontrolltiere) oder Virusapplikation**

A) Tendenzieller Anstieg des enddiastolischen Druckes mit zunehmender Virus-Dosis;

B) Tendenziell vorübergehender Anstieg der dp/dt min bis zur mittleren Dosis, dann wieder einen Abfall;

C): Tendenzieller Abfall bzw. Anstieg der Relaxationsgeschwindigkeit mit zunehmender Virus Dosis (Mittelwerte + SEM).

## V. DISKUSSION

Das Ziel dieser Arbeit war es die Durchführbarkeit der intravenösen Injektion von AAV9-CMV-MLC260-S100A1 als neue einfache Applikationsart für den Gentransfer im Rahmen einer experimentellen Studie an Ratten zu untersuchen. Wegen der Unsicherheit bezüglich der Effektivität und Sicherheit dieser, mit dem Ziel für die kardiale Gentherapie zu nutzenden, systemischen Virus Applikation wurde die vorliegende Untersuchung bewusst als orientierende Pilotstudie an gesunden Tieren mit einer geringen Gruppengröße von  $n = 3$  angelegt. Bei der Feststellung der Effektivität dieser Applikationsform sollten jedoch bereits auch erste Hinweise zu den Effekten auf die kardiale Transduktion, Transfektion und Translation bei ansteigender Virus-Dosis gesammelt werden. Ganz wesentlich für die Beurteilung des Sicherheitsaspektes dieser neuen systemischen Applikationsform war es auch erste Hinweise zur Biodistribution der Fremd-DNA im Rattenorganismus zu erhalten. Dafür wurde die Verteilung der AAVs in extrakardialen Geweben in Abhängigkeit zur ansteigenden Virus-Dosis untersucht. Desweiteren wurde, mittels laboranalytischer Blutuntersuchungen, nach Hinweisen auf beeinträchtigende Effekte auf die Rattengesundheit gesucht. Funktionsanalytische Untersuchungen des Herzens sollten erste Hinweise auf die therapeutische Wirksamkeit des Viruskonstruktes am Zielorgan aufzeigen.

Die wesentlichen nachfolgend besonders zu diskutierenden Ergebnisse dieser Pilotstudie können wie folgt zusammengefasst werden. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei der intravenösen Injektion von AAV9-CMV-MLC260-S100A1 an der Ratte um ein funktionierendes Applikationsmodell mit einem darstellbaren, erfolgreichen Gentransfer handelt. D.h. auch die Methoden zur Analyse des erwünschten (Myokard) bzw. des unerwünschten (zusätzliche Organe) Gentransfers konnten mit Erfolg angewendet werden.



## 1. Versuchsmodell

In der vorliegenden Studie wurde die Ratte als Tiermodell verwendet. Dies geschah, weil an diesem Modell bereits vielversprechende Studien im Bereich der kardialen Genforschung vorangegangen sind und vielfältige publizierte Erfahrungen aus seiner Verwendung insbesondere im Bereich der Toxizitäts- und Arzneimittelforschung vorliegen (SENATSKOMMISSION FÜR TIEREXPERIMENTELLE FORSCHUNG, 2004; IANNACCONE & JACOB, 2009; PATTEN & HALL-PORTER, 2009).

Häufig liefern Studien an Ratten leichter und kostengünstiger zu erzielende wichtige Daten insbesondere im Bereich der Grundlagenforschung. Vor diesem Hintergrund können dann auch aufwändigere Untersuchungen sehr gezielt an Großtiermodellen auch unter Einbindung klinischer Aspekte durchgeführt werden.

Die Herzkatheter-gestützten oder direkten intramyokardialen Applikationsverfahren, die bisher bei der Ratte für den kardialen Gentransfer angewendet wurden, können nur bedingt auf den Menschen übertragen werden (PLEGER et al., 2005; PLEGER et al., 2007; TILEMANN et al., 2012). Zum Beispiel würde ein bei der Ratte erforderliches kurzzeitiges Abklemmen der *Aorta* und *A. pulmonalis* beim Menschen in einer klinischen Studie zur Arzneimittelizulassung einer Gentherapie nicht durchgeführt werden. Bei der Arzneimittelizulassung der Gentherapeutika, verhält es sich ähnlich wie bei onkologisch relevanten Medikamenten. Sie werden nicht zuerst in gesunden oder leicht erkrankten, sondern zuerst in schwer erkrankten Probanden getestet, da die Gentherapie zeitlich nicht begrenzt ist. Bei den Patienten in diesen Erkrankungsstadien ist die klinische Umsetzung einer Operation, wie oben angesprochen, nicht realistisch und würde von den zuständigen Behörden nicht genehmigt werden. Die systemische intravenöse Injektion wird dagegen auch bei Großtieren und Menschen oftmals in der Therapie angewendet und gilt dort als sichere und einfach durchzuführende Applikationsmethode für Arzneimittel.

Ein weiterer sehr positiver Aspekt der Ratte als Tiermodell für wissenschaftliche tierexperimentelle Studien ist deren geringere Körpergröße. Unter anderem ist damit die therapeutisch benötigte Menge an AAV9-Viruslösung pro Tier in der vorliegenden Studie zum Gentransfer mit maximal  $1 \cdot 10^{11}$  wesentlich geringer als zum Beispiel bei einer Studie am Schwein mit  $1,5 \cdot 10^{13}$  pro Tier (WEBER et al., 2014). Dies bedeutet einen deutlich geringeren Zeit- und Arbeitsaufwand zur

Herstellung der Virus-Lösung und ist dadurch auch mit weniger Kosten verbunden.

Da in dieser Studie trotz nachgewiesener extrakardialer Transduktion des Virus und extrakardialer Expression des S100A1-Proteins, keine Beeinträchtigung der Gesundheit der Versuchstiere aufgetreten sind, könnte man vorsichtig daraus schließen, dass selbst, wenn der AAV-Vektor auch beim Menschen nicht ausschließlich nur im Herzen exprimiert werden würde, es zu keiner eindeutig erkennbaren negativen Beeinträchtigung der Gesundheit beim Menschen kommen dürfte.

## **2. Kardialer Gentransfers nach intravenöser Gentherapie**

Nach der systemischen intravenösen Injektion von AAV9-CMV/MLC260-S100A1 konnte wegen der geringen Zahl der Versuchstiere im linken und rechten Ventrikel nur ein tendenzieller, aber zahlenmäßig deutlicher dosisabhängiger Anstieg der viralen Genomkopien, der humanen S100A1mRNA, sowie der S100A1 Proteinexpression festgestellt werden. Allein bei der hS100A1 mRNA und deren Proteinexpression war der Anstieg bei höchsten Virus-Dosis im Vergleich zu den Werten bei der Kontrollgruppe signifikant.

Darüberhinaus war zu erkennen, dass es im Gehalt an endogener rS100A1 mRNA in den Gewebeproben des linken und rechten Ventrikels keinen Unterschied gibt. Dieses Ergebnis stimmt mit kürzlich ebenfalls am Rattenherz erhobenen, aber bisher noch unveröffentlichten, Daten unserer Arbeitsgruppe überein. Im Gegensatz dazu wurde im Herzen des Schweines nachgewiesen, dass im linken Ventrikel deutlich mehr S100A1 mRNA als im rechten Ventrikel vorhanden ist (REMPPIS et al., 1996). Die Bedeutung dieser Befunde ist bisher unklar. Ihnen könnte ein tierartspezifischer Unterschied zugrunde liegen und sollte im Auge behalten werden.

Der Gehalt an endogener rS100A1 mRNA wurde durch die steigende Virus-Dosierung beim intravenösen Gentransfer nachweislich nicht beeinflusst. D. h. die Vorgehensweise des additiven Gentransfers durch das Hinzufügen eines zusätzlichen, therapeutischen Gens hat offensichtlich keine Wirkung dahingehend, dass das eigene ursprüngliche Gen gehemmt oder reprimiert wird.

Unterstützt wird die Vermutung insbesondere dadurch, dass in der vorliegenden Studie auch bei einem deutlichen Überangebot humaner S100A1 zu keiner

negativen Beeinflussung des Gehaltes an endogenem S100A1 kommt.

In der Literatur wird ein erfolgreicher kardialer AAV9 Gentransfer nach intravenöser Applikation in die Schwanzvene bei Mäusen bestätigt. Die dabei verwendeten Virus-Dosierungen befanden sich in einem Dosisbereich von  $1 \cdot 10^{10}$  bis  $1,8 \cdot 10^{12}$  viralen Genomkopien pro Maus (INAGAKI et al., 2006; ZINCARELLI et al., 2008).

(FANG et al., 2012) führten einen Gentransfer an Mäusen und dabei auch einen direkten Vergleich zwischen intravenöser (*V.jugularis*) (n=13) und indirekter intrakoronarer (n=14) AAV9 Injektion durch. Die Virus-Dosis bei den beiden Applikationsverfahren betrug jeweils  $5 \cdot 10^{11}$  virale Genomkopien pro Maus. Nach der intrakoronaren Injektion zeigte sich eine 2,8-fach höhere Anzahl an viralen Genomkopien im linken Ventrikel. In diesem Gewebe zeigte sich auch eine starke und heterogen auftretende Expression.

Durch die intravenöse Injektion wurde eine homogene, aber schwächere Expression im linken Ventrikel erreicht. Die Anzahl an im Herzgewebe der Maus nachgewiesenen viralen Genomkopien war trotz höherer Virus-Dosis wesentlich geringer als in der vorliegenden Studie. So wurden im Vergleich zu den bei der höchsten Virus-Dosis im Rattenherz dieser Studie erhaltenen Genomkopien bei der intrakoronaren 52,6 % und bei der intravenösen Injektion 81,1 % weniger virale Genomkopien im Mäuseherz nachgewiesen.

Dieser große Unterschied könnte tierartspezifisch sein. Erfahrungswerte unserer Arbeitsgruppe (Daten nicht veröffentlicht) zeigen, dass bei Mäusen oft eine sehr hohe Virus-Dosis eingesetzt werden muss, um den gewünschten Effekt überhaupt zu erreichen. Es kann aber auch der Ort für die intravenöse Applikation eine wichtige Rolle spielen. Die *V.jugularis* der Maus ist sehr dünn und es besteht die Gefahr eines Paravasat, so dass nicht die gesamte Virus-Lösung in den Kreislauf gelangen kann.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen einen Zusammenhang zwischen der injizierten ansteigenden Virus-Dosis und den viralen Genomkopien im Herzgewebe der Ratte (LV:  $r = 0,9904$ ; RV:  $r = 0,9902$ ). Dieser ist jedoch aufgrund der geringen Tierzahl ohne Signifikanz. Ein hoch signifikanter linearer Zusammenhang wurde jedoch zwischen Virus-Dosis und S100A1 Proteinexpression beobachtet (LV:  $r = 0,9965$ ;  $p < 0,0035$ ; RV:  $r = 0,9995$ ;  $p < 0,0005$ ). Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass es sich bei dem

intravenösen Gentransfer um eine sehr wirksame Applikationsart handelt, und zwar gerade im Hinblick auf seine therapeutische Nutzung.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten sogar darauf hin, dass über die injizierte Virus-Dosis tatsächlich die im Zielgewebe ankommende Proteinexpression beeinflusst oder möglicherweise sogar gesteuert werden kann. In weiterführenden Studien sollte untersucht werden, ob der Zusammenhang zwischen Virus-Dosis und Proteinexpression rattenpezifisch ist oder auch auf andere Spezies übertragen werden kann.

Der in Abb.IV.12 erkennbare Zusammenhang, dass sich bei deutlich steigender Virus-Dosis die Proteinexpression im Herzgewebe sich einem Plateau-Wert annähert, ist ein wichtiger Hinweis. Daraus lässt sich schließen, dass ab einer bestimmten Virus-Dosis bei weiterer Dosissteigerung keine weitere Erhöhung der Proteinexpression im Zielgewebe mehr erreicht werden kann.

Die Werte der S100A1 Proteinexpression im Myokard (siehe Abb.10A-F) geben einen Hinweis auf die Überexpression an S100A1 im Gesamthomogenats der Gewebeproben. Die gerasterte mikroskopische Durchsicht von histologischen Schnitten des linken und rechten Ventrikels und deren Auswertung zeigte jedoch, dass nicht jede Kardiomyozyte transduziert und dadurch humanes S100A1 exprimiert wurde.

Zur genauen Beurteilung der Transduktionseffizienz wurden die entsprechenden S100A1 Proteinexpressionswerte pro transduzierte Kardiomyozyte berechnet und in der nachfolgenden Tabelle (Tab.V.1) dargestellt.

**Tabelle V.1: Werte der humanen S100A1 Expression im linken und rechten Ventrikel des Rattenmyokards nach i.v. Applikation in drei Dosierungen**

Organ	Virus-Dosis	S100A1	Anteil an	S100A1
		Proteinexpression	S100A1	Proteinexpression
		im Gesamt-myokard	transduzierten	pro transduzierte
		[n-fach]	Kardiomyozyten	Kardiomyozyte
			[%]	[n-fach]
		a)	b)	c)
LV	$1 \cdot 10^{10}$	6	11	55
	$5 \cdot 10^{10}$	26	27	96
	$1 \cdot 10^{11}$	44	40	110
RV	$1 \cdot 10^{10}$	2	4	50
	$5 \cdot 10^{10}$	6	14	43
	$1 \cdot 10^{11}$	12	27	44

a) die Werte wurden aus der Western Blot Analyse des Myokards übernommen

b) die Werte wurden aus der Analyse der histologischen Gewebeschnitte des Myokards übernommen

c) die Berechnung dieser Werte erfolgte:  $100/b = x$  ;  $x \cdot a = c$ ;

z.B. RV  $1 \cdot 10^{10}$  : 4 % an transduzierten Kardiomyozyten (das entspricht 1/25 der gesamten Kardiomyozyten in den Gewebeproben) tragen zu einer 2-fachen S100A1 Proteinexpression im Gesamthomogenat des Myokards bei.



$$100/4 = 25; 25 \cdot 2 = 50$$

d.h. 4 % transduzierte Kardiomyozyten mit einer 50-fachen S100A1

Proteinexpression pro Kardiomyozyte resultieren in einer 2-fachen S100A1 Proteinexpression im Gesamtmyokard

Dabei wird deutlich, dass es in den Kardiomyozyten, die tatsächlich transduzierten wurden, es zu einer sehr viel höheren Expressionsrate von humanem S100A1 kommt. In der Literatur ist beschrieben, dass es bei Ratten mit 40 % S100A1 transduzierten Kardiomyozyten im Myokard bzw. bei isolierten neonatalen Kardiomyozyten mit niedriger (4-fachen) bis mittlerer (10-fachen) S100A1 Proteinüberexpression zu therapeutischen Effekten wie z.B. einer signifikanten Verbesserung der kardialen Funktion, basierend auf einer verbesserten Auswurfraction, kommt (PLEGER et al., 2007; WEBER et al., 2014).

Durch die Ergebnisse dieser Studie ist eine rückwertige Aufarbeitung älterer Daten unserer Arbeitsgruppe möglich. Jedoch ist aufgrund dessen, dass in der vorliegenden Studie die Transduktionseffizienz im Myokard durch die S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten und in den zwei anderen Studien mittels GFP-Fluoreszenz der Gewebeschnitte ermittelt wurde, kein direkter Vergleich möglich. Dennoch lässt sich eine tendenzielle Aussage treffen. In den zwei Studien wurde jeweils in einem Herzinsuffizienz-Modell an der Ratte eine S100A1 Gentherapie mittels intrakoronarer Applikation durchgeführt.

(PLEGER et al., 2007) zeigten bei einer 40 % igen S100A1 Transduktion der Gewebeschnitte eine ca. 1,3-fache S100A1 Proteinüberexpression im Gesamthomogenat bezogen auf die normalen S100A1 Proteinlevel. Mit dem Rechenansatz dieser Studie ergibt das eine 3,25-fache S100A1 Proteinexpression pro transduzierte Kardiomyozyte.

Die histologischen GFP-fluoreszierenden Bilder des Myokards der Studie von (MOST et al., 2004) erlauben eine Schätzung des transduzierten Gewebes von ebenfalls 40 %. In dieser Studie normalisierte sich die S100A1 Expression im Myokard innerhalb von 7 Tagen p.i.. Das entspricht einer 1-fachen S100A1 Proteinüberexpression im Gesamthomogenat und bedeutet eine 2,5-fache S100A1 Proteinexpression pro transduzierte Kardiomyozyte. Dieser Ergebnisse bestätigen den therapeutischen Bereich der S100A1 Proteinexpression dieser Studien und zeigen deutlich, dass eine geringe S100A1 Proteinexpression bereits für positive therapeutische Effekte ausreicht.

Eine indirekte Wirkung von S100A1 überexprimierenden Kardiomyozyten auf angrenzende Kardiomyozyten, die dort zu einer Funktionsverbesserung führt, könnte eine mögliche Erklärung sein. Ein derartiger Sachverhalt ist in der Literatur bereits beschrieben (PLEGER et al., 2007).

Des Weiteren wurde in einer Studie an Schweinen gezeigt, dass eine geringe (3-fache) S100A1 Protein-Überexpression ausreicht, um positive therapeutische Auswirkungen der Gentherapie z.B. eine verbesserte kardiale Auswurfraction nachzuweisen (WEBER et al., 2014). (WEBER et al., 2014) zeigten zu dem, dass bei einer 45-fachen S100A1 Protein-Überexpression in neonatalen Kardiomyozyten die positiven Effekte, z.B. ein erhöhter intrazellulärer Calcium-Transient nicht nachzuweisen sind.

Vor diesem Hintergrund liegt die Überlegung nah, ob mit einem schwächeren Promotor im Vektorkonstrukt auch eine homogene Transduktion im Myokard erreicht werden kann. Das Ziel weiterführender Studien sollte eine homogene Transduktion im Myokard mit einer ca. 40 % Transduktionseffizienz bei einer ca. 4-fachen S100A1 Proteinexpression pro Kardiomyozyte sein.

### **3. Einfluss der intravenösen Applikation auf die Verteilung der S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten im Myokard**

Die Abbildungen IV.15 – 19 zeigen einen tendenziell zunehmenden, prozentualen Anteil an S100A1 exprimierenden Zellen bei ansteigender Virus-Dosis in den histologischen Schnitten des linken und rechten Ventrikels. Gleichzeitig wurde mit Hilfe der mittleren Standardabweichung aller Gesamtmittelwerte der S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten gezeigt, dass die Verteilung der transduzierten Zellen im linken Ventrikel homogener wird (Abb.IV.20).

Zur Berechnung dieser Daten wurden die Fotos der mikroskopischen Schnitte gerastert und diese einzeln ausgewertet. Um ein möglichst genaues Verteilungsergebnis zu bekommen wurden die erhaltenen Einzelwerte pro Raster gemittelt, ins Verhältnis zur Gesamtschnittfläche gesetzt und davon die Standardabweichung berechnet. Durch diese Standardisierung konnte erreicht werden, dass die Raster mit geringem oder großem Gewebeanteil zahlenmäßig fassbar wurden.

Angaben zur Verteilung transduzierter Kardiomyozyten nach einem Gentransfer werden in der Literatur mehrfach gegeben. (HAJJAR et al., 1998) zeigte an Ratten, dass durch einen adenoviralen Gentransfer, bei dem die Virus-Lösung

über einen apikalen Herzkatheter injiziert und Aorta, sowie Pulmonalarterie kurzzeitig abgeklemmt werden, eine homogene Transduktion des Myokards beider Ventrikel erreicht werden kann. (FANG et al., 2012) analysierte in einer Vergleichstudie an Mäusen histologischer Gewebeschnitte des linken Ventrikels mittels Fluoreszenzmikroskopie. Dabei konnte gezeigt werden, dass es bei einer intrakoronaren Virusapplikation zwar zu einer größeren Fluoreszenzintensität im Myokard, sprich zu einer stärkeren Transduktion, aber einer ungleichmäßigeren Verteilung der transduzierten Kardiomyozyten kommt.

Dies wurde mehrfach, unter anderem auch in Herzkatheter-gestützten S100A1-Gentransfer-Studien an Ratten und Schweinen bestätigt (MOST et al., 2004; PLEGER et al., 2005; PLEGER et al., 2007; WEBER et al., 2014). In der Studie von (FANG et al., 2012) wurde ebenfalls gezeigt, dass es bei einer systemischen intravenösen Virus-Applikation (*V.jugularis*) zu einer niedrigen Fluoreszenzintensität im gesamten Myokard, d.h. einer geringeren Transduktionseffizienz, aber zu einer homogenen Verteilung der transduzierenden Kardiomyozyten kommt. Basierend auf diesen Erkenntnissen kann ein Einfluss der Applikationsart des Gentransfers auf die Verteilung der transduzierten Kardiomyozyten nicht ausgeschlossen werden.

#### **4. Biodistribution des AAV9-Vektors nach systemischer intravenöser Applikation**

Zur Erfassung von Nebenwirkungen eines auf das Herz als Zielorgan ausgerichteten Gentransfers mit dem Konstrukt AAV9-VMC/MLC260-S100A1 wurden die Organe Leber, Niere, Milz und Gehirn molekularbiologisch untersucht. In Leber, Niere und Milz konnte mit zunehmender Virus-Dosis eine tendenziell zunehmende Anzahl viraler Genomkopien nachgewiesen werden. Im Gehirn (n=1) waren ebenfalls virale Genomkopien nachweisbar, allerdings konnte aufgrund der geringen Tierzahl auch kein tendenzieller Bezug zur injizierten Virus-Dosis hergestellt werden.

Ein tendenzieller Anstieg der humanen S100A1 mRNA, ebenso wie eine erfolgreiche Translation wurden nur in der Leber nachgewiesen. Dieser extrakardiale Effekt wird in der Literatur bestätigt und scheint unabhängig von Applikations- und Tierart aufzutreten (INAGAKI et al., 2006; ZINCARELLI et al., 2008; FANG et al., 2012; WEBER et al., 2014; RINCON et al., 2015).



Die Wahl des AAV-Serotyps scheint dafür allerdings eine wichtige Rolle zu spielen, denn bei der Verwendung von AAV9 anstatt von AAV5 und AAV6 zeigt sich in der Ratte eine höhere Affinität zur Leber (FANG et al., 2012).

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Untersuchung ein signifikanter Zusammenhang der injizierten Virus-Dosierungen und der Proteinexpression in der Leber nachgewiesen ( $r = 0,9991$ ;  $p < 0,0009$ ), der Anstieg der S100A1 Proteinexpression war dort ähnlich hoch wie linken und rechten Ventrikels des Herzens. Weder in der Niere noch in der Milz konnte ein Zusammenhang zwischen Virus-Dosis und S100A1 Proteinexpression aufgezeigt werden. Jedoch wurde ein tendenzieller Zusammenhang zwischen der injizierten Virus-Dosis und der Zahl der viralen Genomkopien in allen drei Organen (Leber ( $r = 0,9573$ ), Niere ( $r = 0,9697$ ), und Milz ( $r = 0,9930$ ) erkennbar. Dies deutet darauf hin, dass in Niere und Milz zwar eine Transduktion, jedoch weder eine Transkription noch eine Translation stattgefunden haben. Eine mögliche Erklärung könnte die Inaktivität des Promoters in diesen Geweben sein. In der Literatur ist dieser Gedanke bereits ebenfalls beschrieben (INAGAKI et al., 2006)

Bei der Darstellung von Auswirkungen der jeweiligen Organdurchblutung auf die Transduktionseffizienz in den verschiedenen Organen wurde für jede der drei verwendeten Virus-Dosierungen ein hochsignifikanter linearer Zusammenhang berechnet (Tab.IV.4). In den Organen mit höherer Durchblutung (z.B. Leber) konnten jedoch nicht immer auch mehr virale Genomkopien nachgewiesen als in Organen mit geringerer Durchblutung. So stellt z.B die Niere eine Ausnahme dar, die trotz hoher Durchblutung nur eine geringe Genomanzahl aufweist. Die Niere hat ein 4-6-fach höheres endogenes rS100A1 mRNA Level im Vergleich zu Kontrollwerten des linken Ventrikels. Die Ergebnisse dieser Studie legen zwar nahe, dass es selbst bei einer hohen Überexpression des humanen S100A1 zu keiner Beeinflussung der endogenen S100A1 Level kommt. Andererseits könnten die vorliegenden Beobachtungen an der Niere jedoch darauf hindeuten, dass ein hoher endogener S100A1 mRNA-Gehalt die Transduktionseffizienz für das Fremdprotein beeinträchtigt.

Die Biodistributionsanalyse der vorliegenden Pilotstudie lässt bereits erkennen, dass es trotz kardialen Gewebetropismus des AAV9 und des herzspezifischen Promoters MLC260, der durch den CMV noch verstärkt wird, zu einer Transduktion und Translation auch in zahlreichen extrakardialen Geweben kommt. Das Ergebnis der Korrelationsanalyse zeigt, dass für deren Umfang die Durchblutung der einzelnen Organe ganz maßgeblich Einfluss nimmt.

Trotz der in Bezug auf das Herz optimalen transduktionalen und translationalen Zielsetzung durch die dafür geeignete Vektor- und Promoterwahl (TILEMANN et al., 2012) kommt es in der Leber zu einer Translation und der damit verbundenen S100A1 Expression. Die Ursachen dieses unerwünschten Effektes sind noch nicht geklärt. Eine könnte eventuell auf den unspezifischen Zelltropismus des CMV-Enhancers zurückzuführen sein (MULLER et al., 2007), der in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich wegen seiner sehr ausgeprägten Verstärkerfunktion verwendet wurde. Die bei allen Virus-Dosierungen nicht vorhandene Expression in Niere und Milz lässt darauf schließen, dass eine dosisabhängige unspezifische Expression durch den CMV-Enhancer eher unwahrscheinlich ist.

Aufgrund der sehr hohen S100A1 Überexpression bei allen Virus-Dosierungen im Myokard wäre es für weiterführende Studien anzuraten auf den CMV-Verstärker zu verzichten. Eventuell hätte dies auch eine verminderte oder ganz fehlende extrakardiale Fremdgen-Expression zu Folge.

## **5. Gesundheitliche Auswirkungen der systemischen intravenösen Virus-Applikation**

Insbesondere die extrakardiale Transduktion des AAV9-Konstruktes erhöht die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von gesundheitsbeeinträchtigenden Nebenwirkungen.

In der vorliegenden Studie wurden deshalb im Rahmen der finalen Untersuchungen (42.Tag p.i) Blutproben entnommen und diverse laboranalytische Parameter im Hinblick auf quantitative Abweichungen analysiert.

Die Niere ist ein Schlüsselorgan für die Homeostase des Elektrolythaushaltes. Dieser nimmt unter anderem Einfluss auf den Wasserhaushalt, den Blutdruck und die Erregungsleitung in Herz- und Muskelzellen. Die meisten physiologischen Funktionsabläufe im Körper sind auf ein extrazelluläres Elektrolytgleichgewicht angewiesen.

Die Plasmagehalte an Natrium, Kalium und Chlorid zeigten keine Veränderungen. Calcium zeigte eine signifikante Zunahme von 11,95 % allein bei der höchsten Virus-Dosis im Vergleich zur Kontrollgruppe. Alle Elektrolytgehalte, einschließlich Calcium, befinden sich innerhalb des beschriebenen Referenzbereiches für Ratten (EWRINGMANN, 2014). Eine zum Zeitpunkt Tag 42 noch erkennbare negative Beeinträchtigung der Nierenfunktion kann dadurch eigentlich ausgeschlossen werden.

Zum Ausschluss einer Beeinträchtigung der Leber wurden die Aktivität der Enzyme ALT, AST und Albumin im Blutplasma gemessen. Die Alanin-Aminotransferase (ALT) kommt hauptsächlich im Zytosol der Hepatozyten vor und gilt damit als leberspezifischer Zellparameter, da schon bei geringer Leberzellschädigung deren Aktivität extrazellulär, also im Blut ansteigt. Die Aspartat-Aminotransferase (AST) kommt neben den Hepatozyten, auch in Kardiomyozyten und in Skelettmuskelzellen vor. Sie wird bei starker Leberzellschädigung oder einem akuten Myokardinfarkt freigesetzt.

Beide Parameter waren im Blutplasma nicht verändert, was auf eine normale Leberzellintegrität zum Zeitpunkt der Blutentnahme hindeutet.

Die Konzentration des Plasmaproteins Albumin zeigte bei den Ratten mit der Applikation der höchsten Virus-Dosis ähnlich wie bei Calcium die Tendenz einer Zunahme. Albumin wird in der Leber synthetisiert, deshalb kann man daraus

schließen, dass 42 Tage nach der Virusapplikation trotz der unerwünschten Transduktion und Translation im Lebergewebe keine anhaltende Schädigung der Leber vorliegt. Diese, zum Gesundheitsstatus der Versuchstiere beurteilenden, Beobachtungen stimmen mit den Ergebnissen bisheriger Studien überein z.B. (PLEGER et al., 2011). Die geringfügig erhöhte Albuminkonzentration nach Applikation der höchsten Virus-Dosis befanden sich noch im beschriebenen Referenzbereich (EWRINGMANN, 2014), weshalb eine negative Beeinträchtigung des Körpers ausgeschlossen werden kann. Ein Albuminmangel hätte entweder auf eine verminderte Syntheseleistung der Leber wie z.B. im Hungerzustand oder auf einen hohen Albuminverlust über die Nieren oder den Darm hindeuten können.

Als Indikatoren für eine eingeschränkte Nierenfunktion wurden die Konzentrationen von Kreatinin und Harnstoff im Blutplasma bestimmt, die im Vergleich zu den Werten bei den Kontrolltieren keine auffälligen Änderungen zeigten. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die aufgezeigte Transduktion in der Niere bis zum Tag 42 zu keiner anhaltenden negativen Beeinträchtigung des Organs führt. Aufgrund der in der Niere nicht vorhandenen extrakardialen S100A1 Expression kann bezüglich einer möglichen renalen Schädigung durch eine S100A1 Überexpression keine Aussage gemacht werden.

Zur Überprüfung der Gerinnungsfunktion wurden Quick, Fibrinogen und die aPTT im Citratplasma bestimmt. Sie zeigten ebenfalls an Tag 42 nach der Virusapplikation keine Virus-Dosis bezogenen Veränderungen, so dass eine lang anhaltende negative Beeinflussung der Blutgerinnung durch die systemische intravenöse Applikation ausgeschlossen werden kann. Veränderte Quick- und Fibrinogen-Werte könnten zusätzlich auch zur Beurteilung der Syntheseleistung in der Leber herangezogen werden, denn dort werden die meisten Gerinnungsfaktoren synthetisiert.

Zahlreiche Ergebnisse der vorliegenden Studie bestätigen die an Schweinen erhaltenen Befunde einer vorangegangenen Studie unserer Arbeitsgruppe (WEBER et al., 2014). 3 Monate nach der retrograden AAV6 Virus-Applikation in Schweinen wurden ebenfalls keine Konzentrationsveränderungen bei folgenden hämatologischen Parametern nachgewiesen: Natrium, Kalium, Kreatinin, Harnstoff, ALT, AST. Zusätzlich zu diesen Parametern wurden in der Studie am Schwein auch keine wesentlichen Veränderungen bei den Erythrozyten, den

Leukozyten, den Thrombozyten, dem Hämoglobingehalt der Erythrozyten, dem Glucosespiegel und der Lipaseaktivität im Blut beobachtet (WEBER et al., 2014).

(MANNO et al., 2006) zeigte in einer klinischen Studie am Menschen im Rahmen einer AAV-vermittelten Gentherapie bei schwerer Hämophilie B eine Erhöhung von ALT und AST in Kombination mit einem Rückgang des Gerinnungsfaktor IX. Es wird vermutet, dass eine zellvermittelte Immunantwort ursächlich für beide Effekte ist (MANNO et al., 2006). Derartige Effekte wurden in vorangegangenen präklinischen Tierstudien nicht beobachtet (WANG et al., 2000). In nachfolgenden klinischen Langzeitstudien am Menschen, deren Ziel die Untersuchung einer AAV-Gentherapie bei schwerer Hämophilie B war, konnten jedoch die bereits oben genannten Nebenwirkungen wieder beobachtet werden. Die Behandlung mit Glukokortikoiden zeigte eine schnelle Verbesserung der Leberenzymwerte ohne Beeinflussung der Transgenexpression (NATHWANI et al., 2011; NATHWANI et al., 2014). In Verbindung mit der kardialen Gentherapie konnten solche Nebenwirkungen in den humanen CUPID Studien bisher nicht nachgewiesen werden (JASKI et al., 2009; JESSUP et al., 2011; GREENBERG et al., 2016).

## **6.        Herzfunktionsbeeinflussung        durch        den        S100A1              Gentransfer**

Die Druck-Volumen-Messungen der vorliegenden Pilotstudie können bei der Darstellung diverser Herzfunktionsparameter durch die intravenöse AAV9-CMV/MLC260-S100A1 lediglich eine Tendenz aufzeigen. Wegen der geringen Anzahl an behandelten Tieren pro Gruppe und an Kontrolltieren konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. So deutet sich bezüglich der Herzkraft nur tendenziell bis zur mittleren Virus-Dosis eine geringgradig zunehmende positive inotrope Wirkung an. Dieser positive Effekt konnte bereits in mehreren Studien gezeigt und auch statistisch belegt werden (MOST et al., 2003). Der tendenzielle Abfall dieses Herzfunktionsparameters in der vorliegenden Studie bei der höchsten Virus-Dosis ist aufgrund der geringen Gruppengröße schwer zu beurteilen. Jedoch zeigten (WEBER et al., 2014) in Experimenten an isolierten neonatalen Kardiomyozyten ähnlich negative Effekte einer hohen Virus-Dosis mit 45-facher zellulären S100A1 Proteinüberexpression in der Folge. Positive Effekte waren in der oben genannten Studie bis zu einer 4 – 10-fachen S100A1 Überexpression festzustellen.

Diesen und unseren Erkenntnissen zu Folge ist es für eine positive therapeutische Beeinflussung der Herzfunktion mittels eines Gentransfers von großer Wichtigkeit, diejenige Virus-Dosis zu finden und einzusetzen, bei der die therapeutisch wirksame Expressionshöhe des S100A1 pro Kardiomyozyte gerade noch erreicht wird. Ein Überschreiten dieser „optimalen“ Virus-Dosis würde offensichtlich den gewünschten und erzielbaren therapeutischen Effekt des Gentransfers wieder einschränken. Desweiteren wäre dies technisch aufwändiger und mit deutlich höheren Kosten verbunden.

## 7. Ausblick

Berücksichtigt man die in der vorliegenden Studie gentechnisch induzierten Veränderungen am Herzen, so sprechen sie dafür – trotz häufig fehlender Signifikanz – daß mit der systemischen intravenösen Injektion von AAV9-CMV/MLC260-S100A1 eine einfacher zu handhabende, sichere alternative Applikationsart die angestrebten Erfolge in der kardialen Gentherapie erreicht werden können. So ist der intravenöse kardiale Gentransfer nicht nur mit erfolgreicher kardialer Transduktion und Translation, sondern auch mit bisher nur tendenziell auftretenden positiven Auswirkungen auf die Herzfunktion sehr vielversprechend. Hinzu kommt die bei dieser Applikationsart auftretende sehr homogene Verteilung S100A1 exprimierender Zellen im Myokard.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen aber auch, dass es bei den angewendeten Virus-Dosierungen zu einer massiven S100A1 Überexpression in den transduzierten Einzelzellen und dadurch zu einer unnötigen Überschreitung des therapeutischen Wirkungsbereichs kommt.

Weiterhin konnte in dieser Pilotstudie erstmals gezeigt werden, dass es im Rahmen eines erfolgreichen intravenösen kardialen Gentransfers mit ansteigender Virus-Dosis zu einer unerwünschten Transduktion und Translation in der Leber kommt. In den anderen untersuchten Organen (Niere und Milz) konnte lediglich ein tendenzieller Zusammenhang zwischen der ansteigenden Virus-Dosis und der Zahl an viralen Genomkopien nachgewiesen werden. Eine Transduktion hat in diesen Organen stattgefunden, jedoch konnten keine Hinweise auf eine erfolgte Transkription oder Translation gefunden werden. Die genaue Ursache dieses Ergebnisses konnte nicht gefunden werden. Trotz des sich abzeichnenden Risikos von Nebenwirkungen konnten auch bei höchster Virus-Dosis keine Hinweise auf negative Auswirkungen festgestellt werden, was die generelle Sicherheit dieser Applikationsart untermauert.

Weiterführende, auf Teilaspekte der vorliegenden Studie ausgerichtete, Untersuchungen an größeren Tierzahlen erscheinen nicht nur sinnvoll, sondern auch für den therapeutischen Einsatz vielversprechend. So sollte in weiterführenden Studien ein schwächerer Promotor eingesetzt werden, beziehungsweise könnte der MLC260 Promotor jedoch ohne den CMV-Enhancer verwendet werden. Damit könnte, ohne Veränderung der kardialen Transduktionseffizienz, eine geringere S100A1 Proteinexpression pro

Kardiomyozyte erreicht werden. Dadurch könnte eventuell auch die unerwünschte Translation in der Leber verhindert werden.

Die Ähnlichkeiten der humanen Krankheitsbilder z.B. HCM, DCM oder der Restriktiven Kardiomyopathie (RCM) mit denen von Hund und Katze legen nahe, dass weiterführende Studien zum Erfolg der intravenösen Gentherapie auch mit diesen Tierarten durchgeführt werden sollten. Durch diese Verknüpfung der therapeutischen Bemühungen, mittels intravenöser Applikation des bereits mehrfach erfolgreich getesteten Virus-Konstrukts, für die kardiale veterinärmedizinische und die humanmedizinische Gentherapie könnte ein rascher und auch sicherer Erfolg erzielt werden. In beiden medizinischen Bereichen wäre auch die dadurch erreichte einfachere Gestaltung zukünftiger therapeutischer Ansätze ein wertvoller Gewinn.



## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Mittels der Grundlagenforschung erhalten wir in der Regel ein detailliertes, exaktes Verständnis der pathologischen Mechanismen und Abläufe verschiedenster Herz-Kreislauf-Erkrankungen auf molekularer Ebene. Dadurch können wesentlich effizientere Behandlungsmethoden mit eindeutiger Zielsetzung entwickelt werden. Der Gentransfer nutzt derartige molekulare Grundkenntnisse und stellt deshalb derzeit einen der vielversprechendsten Therapieansätze dar. Dabei wird genetisches Material über einen geeigneten Vektor in sogenannte Zielzellen eines Organs gebracht, um mittels nachfolgender Transkription und Expression des Transgens die Krankheitsursache zu beheben.

Durch Kenntnis molekularer Schlüsselemente, insbesondere im Bereich des Calciumstoffwechsels im Myokard, bietet sich das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz für einen diesen Stoffwechsel nachhaltig beeinflussenden therapeutischen Gentransfer an. Bisher wurde dabei der Gentransfer hauptsächlich Herzkatheter-gestützt durchgeführt, so dass ein chirurgischer Eingriff notwendig wurde, der deshalb nicht für jeden Patienten geeignet ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es in einer Pilotstudie Hinweise zu Durchführbarkeit, Sicherheit und Effektivität der wesentlich einfacheren und sicheren systemischen intravenösen Applikation des Virus-Konstrukts im Hinblick auf eine spätere Nutzung in der kardialen Gentherapie zu untersuchen. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde die Methode des somatischen *in vivo* Gentransfers mittels Adeno-assoziiertem Virus des Serotyps 9 (AAV9) unter der Kontrolle des CMV/MLC260 Promotors im Rattenmodell an diversen Kleingruppen (n=3) eingesetzt. Dadurch konnte am 42. Tag post Injektion eine erfolgreiche Transduktion, Transkription und Translation in Gewebeproben des linken und rechten Ventrikel des Herzens erreicht und eine Überexpression von humanem S100A1 auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden.

Die Injektion von 0,9 % NaCl-Lösung (= Kontrolle) und die AAV9-CMV/MLC260-S100A1 Injektion in den drei Virus-Dosierungen ( $1 \cdot 10^{10}$ ,  $5 \cdot 10^{10}$ ,  $1 \cdot 10^{11}$ ) erfolgten jeweils in ein peripheres Gefäß, die *V. femoralis*. Anhand des oben genannten Dosisbereiches sollte überprüft werden, ob sich die AAV9-Verteilung im Zielgewebe (Herz) bei ansteigender Virus-Dosis verändert bzw. sich auch in den anderen Organen manifestiert.

Zum Zeitpunkt 6 Wochen p.i. erfolgten die hämodynamische Funktionsbeurteilung des Herzens anhand der mittels Druck-Volumen-Katheter ermittelten Parameter, sowie eine Blutentnahme zur laboranalytischen Darstellung des Gehaltes an Elektrolyten, Harnstoff, Kreatinin, Albumin, der Aktivität von ALT und AST und der Blutgerinnung. Dem euthanisierten Tier wurden Herz, Leber, Milz, Niere und Gehirn entnommen zur Bestimmung der viralen Genomkopien und des in der Folge exprimierten Fremdproteins in den daraus erstellten Gewebeproben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zum ersten Mal einen Zusammenhang zwischen der injizierten Virus-Dosis und der myokardialen Transduktion, sowie einen signifikanten Zusammenhang der myokardialen Translation und der injizierten Virus-Dosis. Bei ansteigender Virus-Dosis kommt es zum Anstieg der Zahl an viralen Genomkopien und einer erhöhten S100A1 Proteinexpression im Myokard. Ein ähnlicher Dosis-Effekt wurde auch in der Leber beobachtet. In der Niere und der Milz konnten nur Hinweise auf den Dosis-Effekt im Hinblick auf die Transduktion gefunden werden. Diese Beobachtungen deuten auf ein potentielles Risiko der systemischen intravenösen Virusapplikation hin.

In der finalen Untersuchung diverser Blutparameter (s.o.) konnten jedoch weder Hinweise für eine Beeinträchtigung der Funktion von Leber und Niere, noch der Homöostase im Elektrolythaushalts oder bei der Blutgerinnung gezeigt werden. Desweiteren wurde beobachtet, dass mit zunehmender Virus-Dosis die Verteilung der S100A1 exprimierenden Kardiomyozyten in den Gewebeschnitten des linken Ventrikels signifikant homogener wurde. Mittels mikroskopischer Auswertung der histologischen Myokardpräparate bei den verwendeten Virus-Dosierungen wurde zudem eine massive S100A1 Überexpression pro Kardiomyozyte ermittelt.

Die vorliegenden Ergebnisse der Pilotstudie lassen die systemische intravenöse Injektion als einfache, sichere, gut praktizierbare und Erfolg versprechende Applikationsform für die kardiale Gentherapie in der kardialen Veterinär- und Humanmedizin erscheinen.

Vor einem Einsatz dieser Technik in der Gentherapie müssten jedoch zahlreiche der hier nur tendenziell sichtbar gewordenen Ergebnisse in Form von erwünschten, aber auch unerwünschten Wirkungen in nachfolgenden spezifisch ausgerichteten *in vivo* Studien an einer deutlich größeren Gruppen von Ratten statistisch bestätigt oder widerlegt werden.

## VII. SUMMARY

### **An experimental pilot study in rats on the suitability of systemic intravenous injection of adeno-associated viruses (AAVs) as a new application possibility in cardiac gene therapy**

By means of basic research, we usually get a detailed and accurate understanding of the pathological mechanisms and processes of various cardiovascular diseases at the molecular level. Because of this much more efficient methods of treatment can be developed with a clear objective. Gene transfer using such molecular basics and therefore currently represents one of the most promising therapeutic approaches. Genetic material is introduced into so-called target cells of an organ by a suitable vector to correct the cause of the disease by subsequent transcription and expression of the transgene. By knowledge of molecular key elements, in particular calcium metabolism in the myocardium, the clinical picture of heart failure offers for a therapeutic gene transfer with lasting effect influencing this metabolism. So far this gene transfer was performed mainly cardiac catheter based, so that surgery was necessary, which is therefore not suitable for every patient.

The aim of the present study was a pilot study to investigate evidence on the feasibility, safety and effectiveness of the much simpler and safe systemic intravenous administration of viral construct in terms of future use in cardiac gene therapy. To answer this question the method of somatic gene transfer in vivo has been used with an adeno-associated virus serotype 9 (AAV9) under the control of the CMV / MLC260 promoter in a rat model of multiple small groups (n=3). On day 42 post-injection the successful transduction, transcription and translation leads to an overexpression of human S100A1 on mRNA and protein levels in tissue samples of left and right ventricles of the heart.

The injection of 0.9% NaCl solution (= control) and the AAV9- CMV/MLC260-S100A1 injection in the three viral doses ( $1 \cdot 10^{10}$ ,  $5 \cdot 10^{10}$ ,  $1 \cdot 10^{11}$ ) carried out inside a peripheral vessel that femoral vein.

Based on the dose range above should be checked whether the AAV9 distribution changes in the target tissue (heart) with increasing dose of virus or manifests itself also in the other organs. At the time six weeks p.i. hemodynamic function

assessment of the heart has been made based on the determined volume by means of pressure catheter parameters, as well as a blood sample to the laboratory analytical representation of the content of electrolytes, urea, creatinine, albumin, activity of ALT and AST, and blood coagulation. Heart, liver, spleen, kidney and brain of the euthanized animals were removed to determine the viral genome copies and also the expression of the foreign protein in the created tissue samples.

The results show for the first time a relationship between the injected dose of virus and myocardial transduction, as well as a significant association of myocardial Translation and the injected dose of virus. With increasing dose of virus it comes to the increase of the number of viral genome copies and an increased S100A1 protein expression in the myocardium. A similar dose effect was also observed in the liver. In kidney and spleen only references to the dose-effect with regards to the transduction could be found. These observations point to a potential risk of systemic intravenous virus application.

In the final analysis of various blood parameters (see above) no evidence of impairment of the function of liver and kidney, as well as in homeostasis of electrolytes or in blood coagulation could be shown. Furthermore, with an increasing viral dose the distribution of the S100A1 expressing cardiomyocytes in the tissue sections of the left ventricular became significantly more homogeneous. In addition, a massive S100A1 overexpression per cardiomyocyte was determined by microscopic evaluation of the histological myocardium preparations with the used virus doses.

The present results of the pilot study make the systemic intravenous injection appear as a simple, safe, well practicable and promising application form for cardiac gene therapy in cardiac veterinary and human medicine. Prior to the use of this technique in gene therapy, however, the desirable, but also adverse effects from the here only tend visible results should be statistically confirmed or refuted in specifically aimed in vivo studies with a much larger group of rats

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Alazard-Dany N, Nicolas A, Ploquin A, Strasser R, Greco A, Epstein AL, Fraefel C, Salvetti A. Definition of herpes simplex virus type 1 helper activities for adeno-associated virus early replication events. *PLoS Pathog* 2009; 5: e1000340.

Anne KZ, Daniel AM. Immune Responses to Adeno-Associated Virus Vectors. *Current Gene Therapy* 2005; 5: 323-31.

Atkins C, Bonagura J, Ettinger S, Fox P, Gordon S, Haggstrom J, Hamlin R, Keene B, Luis-Fuentes V, Stepien R. Guidelines for the diagnosis and treatment of canine chronic valvular heart disease. *J Vet Intern Med* 2009; 23: 1142-50.

Ayuso E, Chillon M, Garcia F, Agudo J, Andaluz A, Carretero A, Monfar M, Moya M, Montane J, Otaegui PJ, Bosch F. In vivo gene transfer to healthy and diabetic canine pancreas. *Mol Ther* 2006; 13: 747-55.

Balaban RS. Cardiac energy metabolism homeostasis: role of cytosolic calcium. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 1259-71.

Bangert A, Andrassy M, Muller AM, Bockstahler M, Fischer A, Volz CH, Leib C, Goser S, Korkmaz-Icoz S, Zittrich S, Jungmann A, Lasitschka F, Pfitzer G, Muller OJ, Katus HA, Kaya Z. Critical role of RAGE and HMGB1 in inflammatory heart disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: E155-64.

Berns KI, Kotin RM, Labow MA. Regulation of adeno-associated virus DNA replication. *Biochim Biophys Acta* 1988; 951: 425-9.

Bish LT, Morine K, Sleeper MM, Sanmiguel J, Wu D, Gao G, Wilson JM, Sweeney HL. Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat. *Hum Gene Ther* 2008; 19: 1359-68.

Boerries M, Most P, Gledhill JR, Walker JE, Katus HA, Koch WJ, Aebi U, Schoenenberger CA.  $\text{Ca}^{2+}$  -dependent interaction of S100A1 with F1-ATPase leads to an increased ATP content in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 4365-73.

Braunwald E. Heart failure: pathophysiology and treatment. *Am Heart J* 1981; 102: 486-90.

Bundesärztekammer. Richtlinien zum Gentransfer in menschlichen Körperzellen. *Deutsches Ärzteblatt* 1995; 11: A789 - A94.

Bundesgesetz. Embryonenschutzgesetz. 1990;

Buning H. Gene therapy enters the pharma market: the short story of a long journey. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 1-3.

Callejas D, Mann CJ, Ayuso E, Lage R, Grifoll I, Roca C, Andaluz A, Ruiz-de Gopegui R, Montane J, Munoz S, Ferre T, Haurigot V, Zhou S, Ruberte J, Mingozzi F, High KA, Garcia F, Bosch F. Treatment of diabetes and long-term survival after insulin and glucokinase gene therapy. *Diabetes* 2013; 62: 1718-29.

Casal M, Haskins M. Large animal models and gene therapy. *Eur J Hum Genet* 2006; 14: 266-72.

Collins M, Thrasher A. Gene therapy: progress and predictions. *Proc Biol Sci* 2015; 282

Cotugno G, Annunziata P, Tessitore A, O'Malley T, Capalbo A, Faella A, Bartolomeo R, O'Donnell P, Wang P, Russo F, Sleeper MM, Knox VW, Fernandez S, Levanduski L, Hopwood J, De Leonibus E, Haskins M, Auricchio A. Long-term amelioration of feline Mucopolysaccharidosis VI after AAV-mediated liver gene transfer. *Mol Ther* 2011; 19: 461-9.

Didenko VV. DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 2001; 31: 1106-16, 18, 20-1.

Donato R. Perspectives in S-100 protein biology. Review article. *Cell Calcium* 1991; 12: 713-26.

Dzau VJ, von der Leyen HE, Morishita R. The concept and potentials of cardiovascular gene therapy. *Indian Heart J* 1998; 50: 23-33.

Ehlermann P, Remppis A, Guddat O, Weimann J, Schnabel PA, Motsch J, Heizmann CW, Katus HA. Right ventricular upregulation of the Ca(2+) binding protein S100A1 in chronic pulmonary hypertension. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1500: 249-55.

Elmslie RE, Dow SW. Genetic immunotherapy for cancer. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1997; 12: 193-205.

Ewringmann A (2014) Leitsymptome bei Hamster, Ratte, Maus und Rennmaus - Diagnostischer Leitfaden und Therapie Georg Thieme Verlag

Fang H, Lai NC, Gao MH, Miyanoara A, Roth DM, Tang T, Hammond HK. Comparison of adeno-associated virus serotypes and delivery methods for cardiac gene transfer. *Hum Gene Ther Methods* 2012; 23: 234-41.

Fargnoli AS, Katz MG, Williams RD, Kendle AP, Steuerwald N, Bridges CR. Liquid jet delivery method featuring S100A1 gene therapy in the rodent model following acute myocardial infarction. *Gene Ther* 2016; 23: 151-7.

Ferasin L, Sturgess CP, Cannon MJ, Caney SM, Gruffydd-Jones TJ, Wotton PR. Feline idiopathic cardiomyopathy: a retrospective study of 106 cats (1994-2001). *J Feline Med Surg* 2003; 5: 151-9.

Greenberg B, Yaroshinsky A, Zsebo KM, Butler J, Felker GM, Voors AA, Rudy



JJ, Wagner K, Hajjar RJ. Design of a phase 2b trial of intracoronary administration of AAV1/SERCA2a in patients with advanced heart failure: the CUPID 2 trial (calcium up-regulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease phase 2b). *JACC Heart Fail* 2014; 2: 84-92.

Greenberg B, Butler J, Felker GM, Ponikowski P, Voors AA, Desai AS, Barnard D, Bouchard A, Jaski B, Lyon AR, Pogoda JM, Rudy JJ, Zsebo KM. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in patients with cardiac disease (CUPID 2): a randomised, multinational, double-blind, placebo-controlled, phase 2b trial. *Lancet* 2016;

Gupta RC, Mishra S, Rastogi S, Wang M, Rousso B, Mika Y, Remppis A, Sabbah HN. Ca(2+)-binding proteins in dogs with heart failure: effects of cardiac contractility modulation electrical signals. *Clin Transl Sci* 2009; 2: 211-5.

Hajjar RJ, Schmidt U, Matsui T, Guerrero JL, Lee KH, Gwathmey JK, Dec GW, Semigran MJ, Rosenzweig A. Modulation of ventricular function through gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 5251-6.

Hallek M, Buening H, Ried M, Hacker U, Kurzeder C, Wendtner C-M. Grundlagen der Gentherapie Prinzipien und Stand der Entwicklung. *Der Internist* 2001; 42: 1306-13.

Hammoudi N, Ishikawa K, Hajjar RJ. Adeno-associated virus-mediated gene therapy in cardiovascular disease. *Curr Opin Cardiol* 2015; 30: 228-34.

Houser SR, Piacentino V, 3rd, Weisser J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32: 1595-607.

Iannaccone PM, Jacob HJ. Rats! *Dis Model Mech* 2009; 2: 206-10.

Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, McTiernan CF, Kay MA, Nakai H. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther* 2006; 14: 45-53.

Jaski BE, Jessup ML, Mancini DM, Cappola TP, Pauly DF, Greenberg B, Borow K, Dittrich H, Zsebo KM, Hajjar RJ, Calcium Up-Regulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy In Cardiac Disease Trial I. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J Card Fail* 2009; 15: 171-81.

Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, Yaroshinsky A, Zsebo KM, Dittrich H, Hajjar RJ, Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease I. Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* 2011; 124: 304-13.

Jordan B. The return of germline gene therapy. *Med Sci (Paris)* 2015; 31: 691-5.

Kato K, Kimura S. S100a0 (alpha alpha) protein is mainly located in the heart and striated muscles. *Biochim Biophys Acta* 1985; 842: 146-50.

Katz MG, Fargnoli AS, Tomasulo CE, Pritchette LA, Bridges CR. Model-specific selection of molecular targets for heart failure gene therapy. *J Gene Med* 2011; 13: 573-86.

Kettlewell S, Most P, Currie S, Koch WJ, Smith GL. S100A1 increases the gain of excitation-contraction coupling in isolated rabbit ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39: 900-10.

Kiewitz R, Acklin C, Schafer BW, Maco B, Uhrig B, Wuytack F, Erne P, Heizmann CW.  $\text{Ca}^{2+}$  -dependent interaction of S100A1 with the sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$  -ATPase2a and phospholamban in the human heart. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 306: 550-7.

Kinnon C, Levinsky RJ. Somatic gene therapy for genetic disease. *Arch Dis Child* 1990; 65: 72-3.

Kittleson MD, Meurs KM, Munro MJ, Kittleson JA, Liu SK, Pion PD, Towbin JA. Familial hypertrophic cardiomyopathy in maine coon cats: an animal model of human disease. *Circulation* 1999; 99: 3172-80.

Kraus C, Rohde D, Weidenhammer C, Qiu G, Pleger ST, Voelkers M, Boerries M, Remppis A, Katus HA, Most P. S100A1 in cardiovascular health and disease: closing the gap between basic science and clinical therapy. *J Mol Cell Cardiol* 2009; 47: 445-55.

LeCouteur RA. Current concepts in the diagnosis and treatment of brain tumours in dogs and cats. *J Small Anim Pract* 1999; 40: 411-6.

Liu SK, Tilley LP. Animal models of primary myocardial diseases. *Yale J Biol Med* 1980; 53: 191-211.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-8.

Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, Ozelo MC, Hoots K, Blatt P, Konkle B, Dake M, Kaye R, Razavi M, Zajko A, Zehnder J, Rustagi PK, Nakai H, Chew A, Leonard D, Wright JF, Lessard RR, Sommer JM, Tigges M, Sabatino D, Luk A, Jiang H, Mingozzi F, Couto L, Ertl HC, High KA, Kay MA. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 2006; 12: 342-7.

Marenholz I, Heizmann CW, Fritz G. S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 1111-22.

Most P, Bernotat J, Ehlermann P, Pleger ST, Reppel M, Borries M, Niroomand F, Pieske B, Janssen PM, Eschenhagen T, Karczewski P, Smith GL, Koch WJ, Katus HA, Remppis A. S100A1: a regulator of myocardial contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98: 13889-94.

Most P, Remppis A, Pleger ST, Löffler E, Ehlermann P, Bernotat J, Kleuss C, Heierhorst J, Ruiz P, Witt H, Karczewski P, Mao L, Rockman HA, Duncan SJ, Katus HA, Koch WJ. Transgenic overexpression of the Ca<sup>2+</sup>-binding protein S100A1 in the heart leads to increased in vivo myocardial contractile performance. *J Biol Chem* 2003; 278: 33809-17.

Most P, Pleger ST, Volkers M, Heidt B, Boerries M, Weichenhan D, Löffler E, Janssen PM, Eckhart AD, Martini J, Williams ML, Katus HA, Remppis A, Koch WJ. Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium. *J Clin Invest* 2004; 114: 1550-63.

Most P, Seifert H, Gao E, Funakoshi H, Volkers M, Heierhorst J, Remppis A, Pleger ST, DeGeorge BR, Jr., Eckhart AD, Feldman AM, Koch WJ. Cardiac S100A1 protein levels determine contractile performance and propensity toward heart failure after myocardial infarction. *Circulation* 2006; 114: 1258-68.

Most P, Raake P, Weber C, Katus HA, Pleger ST. S100A1 gene therapy in small and large animals. *Methods Mol Biol* 2013; 963: 407-20.

Muller OJ, Lange M, Rattunde H, Lorenzen HP, Muller M, Frey N, Bittner C, Simonides W, Katus HA, Franz WM. Transgenic rat hearts overexpressing SERCA2a show improved contractility under baseline conditions and pressure overload. *Cardiovasc Res* 2003; 59: 380-9.

Muller OJ, Katus HA, Bekeredjian R. Targeting the heart with gene therapy-optimized gene delivery methods. *Cardiovasc Res* 2007; 73: 453-62.

Mulligan RC. The basic science of gene therapy. *Science* 1993; 260: 926-32.

Muzyczka N. Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1992; 158: 97-129.

Nathwani AC, Tuddenham EG, Rangarajan S, Rosales C, McIntosh J, Linch DC, Chowdary P, Riddell A, Pie AJ, Harrington C, O'Beirne J, Smith K, Pasi J, Glader B, Rustagi P, Ng CY, Kay MA, Zhou J, Spence Y, Morton CL, Allay J, Coleman J, Sleep S, Cunningham JM, Srivastava D, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Gray JT, Reiss UM, Nienhuis AW, Davidoff AM. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* 2011; 365: 2357-65.

Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, Rosales C, Chowdary P, McIntosh J, Della Peruta M, Lheriteau E, Patel N, Raj D, Riddell A, Pie J, Rangarajan S, Bevan D, Recht M, Shen YM, Halka KG, Basner-Tschakarjan E, Mingozzi F, High KA, Allay J, Kay MA, Ng CY, Zhou J, Cancio M, Morton CL, Gray JT, Srivastava D, Nienhuis AW, Davidoff AM. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. *N Engl J Med* 2014; 371: 1994-2004.

O'Grady MR, O'Sullivan ML. Dilated cardiomyopathy: an update. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2004; 34: 1187-207.

Olds RJ, Olds Joan R. (1984) *Farbatlas der Anatomie der Ratte* Schober

Patten RD, Hall-Porter MR. Small animal models of heart failure: development of novel therapies, past and present. *Circ Heart Fail* 2009; 2: 138-44.

Pavlin D, Cemazar M, Sersa G, Tozon N. IL-12 based gene therapy in veterinary medicine. *J Transl Med* 2012; 10: 234.

Peters SA. Appendices. Physiologically-Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulations: Principles, Methods, and Application in Pharmaceutical Industry 2012: 407-21.

Pleger ST, Remppis A, Heidt B, Volkers M, Chuprun JK, Kuhn M, Zhou RH, Gao E, Szabo G, Weichenhan D, Muller OJ, Eckhart AD, Katus HA, Koch WJ, Most P. S100A1 gene therapy preserves in vivo cardiac function after myocardial infarction. *Mol Ther* 2005; 12: 1120-9.

Pleger ST, Most P, Boucher M, Soltys S, Chuprun JK, Pleger W, Gao E, Dasgupta A, Rengo G, Remppis A, Katus HA, Eckhart AD, Rabinowitz JE, Koch WJ. Stable myocardial-specific AAV6-S100A1 gene therapy results in chronic functional heart failure rescue. *Circulation* 2007; 115: 2506-15.

Pleger ST, Shan C, Ksienzyk J, Bekeredjian R, Boekstegers P, Hinkel R, Schinkel S, Leuchs B, Ludwig J, Qiu G, Weber C, Raake P, Koch WJ, Katus HA, Muller OJ, Most P. Cardiac AAV9-S100A1 gene therapy rescues post-ischemic heart failure in a preclinical large animal model. *Sci Transl Med* 2011; 3: 92ra64.

Pleger ST, Brinks H, Ritterhoff J, Raake P, Koch WJ, Katus HA, Most P. Heart failure gene therapy: the path to clinical practice. *Circ Res* 2013; 113: 792-809.

Quintin-Colonna F, Devauchelle P, Fradelizi D, Mourrot B, Faure T, Kourilsky P, Roth C, Mehtali M. Gene therapy of spontaneous canine melanoma and feline fibrosarcoma by intratumoral administration of histoincompatible cells expressing human interleukin-2. *Gene Ther* 1996; 3: 1104-12.

Raake P, Pleger ST. Stellenwert der Gentherapie bei Herzinsuffizienz. *Transplantationsmedizin* 2010; 22: 83 - 90.

Raake PW, Tscheschner H, Reinkober J, Ritterhoff J, Katus HA, Koch WJ, Most P. Gene therapy targets in heart failure: The path to translation. *Clin Pharmacol Ther* 2011; 90: 542-53.

Raake PW, Schlegel P, Ksienzyk J, Reinkober J, Barthelmes J, Schinkel S, Pleger S, Mier W, Haberkorn U, Koch WJ, Katus HA, Most P, Muller OJ. AAV6.betaARKct cardiac gene therapy ameliorates cardiac function and normalizes the catecholaminergic axis in a clinically relevant large animal heart failure model. *Eur Heart J* 2013; 34: 1437-47.

Rapacciuolo A, Indolfi C, Di Lorenzo E, Esposito G, Stabile E, Stingone AM, Avvedimento EV, Condorelli M, Chiariello M. Gene therapy for the treatment of restenosis after coronary angioplasty. *Cardiologia* 1994; 39: 843-7.

Rapti K, Louis-Jeune V, Kohlbrenner E, Ishikawa K, Ladage D, Zolotukhin S, Hajjar RJ, Weber T. Neutralizing antibodies against AAV serotypes 1, 2, 6, and 9 in sera of commonly used animal models. *Mol Ther* 2012; 20: 73-83.

Remppis A, Greten T, Schafer BW, Hunziker P, Erne P, Katus HA, Heizmann CW. Altered expression of the Ca(2+)-binding protein S100A1 in human cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1313: 253-7.

Riesen SC, Kovacevic A, Lombard CW, Amberger C. Prevalence of heart disease in symptomatic cats: an overview from 1998 to 2005. *Schweiz Arch Tierheilkd* 2007; 149: 65-71.

Rincon MY, VandenDriessche T, Chuah MK. Gene therapy for cardiovascular disease: advances in vector development, targeting, and delivery for clinical translation. *Cardiovasc Res* 2015; 108: 4-20.

Ritterhoff J, Most P. Targeting S100A1 in heart failure. *Gene Ther* 2012; 19: 613-21.

Rohde D, Brinks H, Ritterhoff J, Qui G, Ren S, Most P. S100A1 gene therapy for heart failure: a novel strategy on the verge of clinical trials. *J Mol Cell Cardiol* 2011; 50: 777-84.

Sade RM, Khushf G. Gene therapy: ethical and social issues. J S C Med Assoc 1998; 94: 406-10.

Sedaghat F, Notopoulos A. S100 protein family and its application in clinical practice. Hippokratia 2008; 12: 198-204.

Senatskommission für tierexperimentelle Forschung VCE. DFG: Tierversuche in der Forschung. Lemmens Verlags- und Mediengesellschaft GmbH Bonn 2004;

Siegl G, Bates RC, Berns KI, Carter BJ, Kelly DC, Kurstak E, Tattersall P. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. Intervirology 1985; 23: 61-73.

Sleeper M, Bish LT, Haskins M, Ponder KP, Sweeney HL. Status of therapeutic gene transfer to treat cardiovascular disease in dogs and cats. J Vet Cardiol 2011; 13: 131-40.

Sleeper MM, Fornasari B, Ellinwood NM, Weil MA, Melniczek J, O'Malley TM, Sammarco CD, Xu L, Ponder KP, Haskins ME. Gene therapy ameliorates cardiovascular disease in dogs with mucopolysaccharidosis VII. Circulation 2004; 110: 815-20.

Sleeper MM, Bish LT, Sweeney HL. Gene therapy in large animal models of human cardiovascular genetic disease. ILAR J 2009; 50: 199-205.

Suckow MA, Weisbroth, Steven H. , Franklin, Craig L. . The Laboratory Rat. Academic Press 2005;

Tidholm A, Haggstrom J, Borgarelli M, Tarducci A. Canine idiopathic dilated cardiomyopathy. Part I: Aetiology, clinical characteristics, epidemiology and pathology. Vet J 2001; 162: 92-107.

Tilemann L, Ishikawa K, Weber T, Hajjar RJ. Gene therapy for heart failure. Circ Res 2012; 110: 777-93.



Tilley LP, Liu SK, Gilbertson SR, Wagner BM, Lord PF. Primary myocardial disease in the cat. A model for human cardiomyopathy. *Am J Pathol* 1977; 86: 493-522.

Tsoporis JN, Marks A, Zimmer DB, McMahon C, Parker TG. The myocardial protein S100A1 plays a role in the maintenance of normal gene expression in the adult heart. *Mol Cell Biochem* 2003; 242: 27-33.

Vinge LE, Raake PW, Koch WJ. Gene therapy in heart failure. *Circ Res* 2008; 102: 1458-70.

Volkers M, Loughrey CM, Macquaide N, Remppis A, DeGeorge BR, Jr., Wegner FV, Friedrich O, Fink RH, Koch WJ, Smith GL, Most P. S100A1 decreases calcium spark frequency and alters their spatial characteristics in permeabilized adult ventricular cardiomyocytes. *Cell Calcium* 2007; 41: 135-43.

Volkers M, Weidenhammer C, Herzog N, Qiu G, Spaich K, von Wegner F, Peppel K, Muller OJ, Schinkel S, Rabinowitz JE, Hippe HJ, Brinks H, Katus HA, Koch WJ, Eckhart AD, Friedrich O, Most P. The inotropic peptide betaARKct improves betaAR responsiveness in normal and failing cardiomyocytes through G(betagamma)-mediated L-type calcium current disinhibition. *Circ Res* 2011; 108: 27-39.

Wang L, Nichols TC, Read MS, Bellinger DA, Verma IM. Sustained expression of therapeutic level of factor IX in hemophilia B dogs by AAV-mediated gene therapy in liver. *Mol Ther* 2000; 1: 154-8.

Weber C, Neacsu I, Krautz B, Schlegel P, Sauer S, Raake P, Ritterhoff J, Jungmann A, Remppis AB, Stangassinger M, Koch WJ, Katus HA, Muller OJ, Most P, Pleger ST. Therapeutic safety of high myocardial expression levels of the molecular inotrope S100A1 in a preclinical heart failure model. *Gene Ther* 2014; 21: 131-8.

Werner P, Raducha MG, Prociuk U, Sleeper MM, Van Winkle TJ, Henthorn PS. A novel locus for dilated cardiomyopathy maps to canine chromosome 8. *Genomics* 2008; 91: 517-21.

Williams DA, Orkin SH. Somatic gene therapy. Current status and future prospects. *J Clin Invest* 1986; 77: 1053-6.

Wright NT, Varney KM, Ellis KC, Markowitz J, Gitti RK, Zimmer DB, Weber DJ. The three-dimensional solution structure of Ca(2+)-bound S100A1 as determined by NMR spectroscopy. *J Mol Biol* 2005; 353: 410-26.

Yla-Herttuala S. Endgame: glybera finally recommended for approval as the first gene therapy drug in the European union. *Mol Ther* 2012; 20: 1831-2.

Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Mol Ther* 2008; 16: 1073-80.

## **IX. DANKSAGUNG**

Ich möchte mich ganz herzlich bei Prof. Dr. med. vet. Manfred Stangassinger dafür bedanken, dass er die Betreuung dieses Projektes übernommen hat und mir als Doktorvater mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Bei Prof. Dr. med. Patrick Most möchte ich mich sehr für die Überlassung dieses interessanten Themas bedanken. Danke Patrick für deine wissenschaftliche Anleitung und die fachlichen Anregungen zu meiner Arbeit.

Dr. Martin Busch danke ich für die geduldige und fachkundige Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ich möchte mich bei den Mitgliedern der AG Most bedanken, besonders bei Jasmin Hoffmann, Fabian Günther und Nils Gade, sowie Nicole Herzog für deren großartige technische und menschliche Unterstützung.

Herrn Roland Galmbacher möchte ich ganz herzlich für die sehr präzise Einweisung in die Mikrochirurgie danken. Lieber Roland, deine Begeisterung für operative Eingriffe hat mich angesteckt und begleitet mich immernoch. Die Gespräche beim Kaffee werden mir fehlen!

Regina und Reiner Biehle, sowie Margret und Hans Fechtig danke ich wirklich sehr für ihre Unterstützung, Geduld und die vielen guten Ratschläge. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Auch bei meinem tollen Bruder Tim möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir immer wieder Mut gemacht und mich positiv in meinem Bestreben bestärkt hat.

Meine Freunde waren mir ebenfalls eine große Hilfe. Sei es mit einem offenen Ohr über's Telefon und beim Ausreiten oder mit direkten motivierenden Worten.

Zum Schluss möchte ich mich bei der Person bedanken, die wohl am meisten von allem mitbekommen hat und trotzdem nicht von meiner Seite gewichen ist.

Meinem Mann Daniel! Ohne dich hätte ich das alles nicht geschafft – Danke von Herzen mein Schatz!